

Maximilian Mayer

Untersuchungen
zur Physiologie der Stomatabewegung

Diss München
1984





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554009_0026

Untersuchungen zur Physiologie der Stomatabewegung

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Fakultät für Biologie
an der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Maximilian Mayer
München

Oktober 1983

1. Berichterstatter: Prof. Dr.P.Dittrich

2. Berichterstatter: Prof. Dr.A. Schmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 20.1.1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Inhaltsverzeichnis

	Seite:
A. EINLEITUNG	1
B. MATERIAL UND METHODEN	8
1. Pflanzenmaterial und Anzucht	8
2. Epidermispräparation und Inkubationstechnik	9
2.1. Epidermispräparation	9
2.2. Enzymatische Schließzellenisolation	9
2.3. Ultraschallbehandlung	9
2.4. Inkubationstechnik	10
2.5. Kontrolle der Stomataöffnung	10
3. Färbemethoden	10
3.1. Kaliumfärbung	10
3.2. Chloridfärbung	11
3.3. Neutralrotfärbung	11
4. $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungstechnik	11
4.1. $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen mit isolierten Epidermen	11
4.2. $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen mit intakten Blättern...	12
4.3. Epidermisinkubation auf ^{14}C -Kohlenhydraten	12
4.4. Microradioautographien	13
4.5. Aufarbeitung der ^{14}C -markierten Epidermen	13
4.5.1. Extraktion der Epidermen	13
4.5.2. Nachweis der markierten Stärke	13
4.5.3. Trennung und Identifikation der markierten Extraktverbindungen	14
4.5.4. Identifikation der markierten Produkte im Inkubationsmedium	14
5. Messung von Enzymaktivitäten	15
5.1. Herstellung des Rohextrakts	15
5.2. Ribulosebiphosphat-Carboxylase	15

	Seite:
5.3.	Malatdehydrogenase 16
5.4.	Malic enzyme 16
5.5.	Phosphoenolpyruvat-Carboxylase 16
5.6.	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase 17
6.	Temperaturabhängigkeit des Öffnens und Schließens 17
7.	Inhibitorversuche und Calciumhemmung 18
C.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION 19
I.	Isolierte Epidermen 19
1.	Vergleich des in vivo- und in vitro-Systems 19
1.1.	Funktion von Apoplast und Epidermisgewebe. 19
1.2.	Biologische Variabilität isolierter Epidermen 21
2.	Nachweis des Kaliums beim Öffnen und Schließen der Stomata in isolierten Epi- dermen 22
2.1.	Einfluß der Vorinkubation auf die Kalium- färbung 22
2.2.	Einfluß der Kaliumverfügbarkeit im Außen- medium auf die Kaliumfärbung 23
2.3.	Einfluß von Abscisinsäure auf die Kalium- färbung 24
2.4.	Chloridfärbungen 24
3.	Öffnen der Stomata in vitro 25
3.1.	Einfluß der Außenkonzentration auf das Öffnen 25
3.2.	Plasmolyse von Epidermis-, Neben- und Schließzellen 26
3.3.	Passives Öffnen durch nachlassenden epidermalen Druck 26

4.	Schließen der Stomata in vitro	27
5.	Zusammenfassung von Kapitel I	27
II.	Epidermisreinigung	31
1.	Epidermispräparationen für $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungsversuche und Enzymstudien	31
2.	Methoden der Epidermisreinigung	32
2.1.	Wahl des Pflanzenmaterials	32
2.2.	Epidermisreinigung durch Ultraschallbehandlung	33
2.3.	Mechanische Epidermisreinigung	33
3.	Methoden der Schließzellenisolation	34
3.1.	Isolation durch Säurebehandlung und durch mechanische Methoden	34
3.2.	Enzymatische Schließzellenisolation	35
3.3.	Kontrollversuche mit enzymatisch lysierten Epidermen	37
4.	Zusammenfassung von Kapitel II	39
III.	$^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen	39
1.	Einfluß verschiedener Puffer auf die $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen	40
2.	Einfluß der Natriumhydrogenkarbonatkonzentration auf die $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen	42
3.	Metabolitenaustausch zwischen Neben- und Epidermiszellen und den Schließzellen.....	43
3.1.	$^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen gereinigter und enzymatisch behandelter Epidermen	43
3.2.	Autoradiographien isolierter Epidermen ...	46
4.	Gluconeogenese	47
4.1.	Herkunft der Zucker in den Schließzellen und Weg der ^{14}C -Markierung der Zucker in isolierten Epidermen	47
4.2.	Lichtabhängigkeit der Gluconeogenese.....	47

	Seite:
4.3. Malatpool und Gluconeogenese	54
5. Einfluß des Inkubationsmediums auf Fixierungsmuster und Fixierungsrate der Schließzellen	56
6. Einfluß von Abscisinsäure auf die Schließzellenfixierungsmuster	61
7. Efflux markierter Verbindungen aus den Schließzellen in Abhängigkeit von der Ionenzusammensetzung des Außenmediums	65
7.1. Efflux in Abhängigkeit von der Kaliumchlorid- und Kaliumsulfatkonzentration....	65
7.2. Einfluß von Abscisinsäure auf den Efflux..	68
7.3. Einfluß von ABA auf den Efflux isolierter Epidermen von $^{14}\text{CO}_2$ -markierten Blättern...	70
8. Zusammenfassung von Kapitel III	72
IV. Enzymaktivitäten in der Epidermis von <i>Commelina communis</i>	75
1. Epidermisenzyme	75
2. Vergleich der Enzymaktivitäten in intakten Epidermen und in Epidermen mit isolierten Schließzellen von <i>Commelina communis</i>	76
3. Zusammenfassung von Kapitel IV	80
V. Reaktivität der Stomata beim Schließen ...	81
1. Phänomere und ABA-Wirkungshypothesen	81
2. Temperaturabhängigkeit des Schließens	82
3. Einfluß von externen Kaliumionen auf die ABA-Wirkung	84
4. Zusammenfassung von Kapitel V	88
VI. Inhibitorversuche	92
1. Voraussetzungen für Inhibitorversuche	93

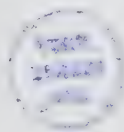
2.	Untersuchungen zur Beteiligung energie- umsetzender Prozesse an der Stomatabewe- gung bei <i>Commelina communis</i>	94
2.1.	Hemmung photosynthetischer Prozesse	94
2.2.	Hemmung der Zellatmung	95
3.	Untersuchungen zur Beteiligung von ATA-asen und thioreagenzsensitiver Proteine an der Stomatabewegung	97
3.1.	Hemmung mitochondrialer ATP-asen	97
3.2.	Hemmung plasmalemmagebundener ATP-asen ...	97
3.3.	Hemmung durch SH-Reagenzien	99
4.	Untersuchungen zum Einfluß von Chlorid- und Kaliumpermeabilität für das Öffnen und Schließen der Stomata	100
5.	Zusammenfassung von Kapitel VI	102
VII.	Calciumwirkung	108
1.	Hemmung der Stomataöffnung bei <i>Commelina</i> <i>communis</i> durch Calcium	108
2.	Beschleunigung des Schließens der Stomata von <i>Commelina communis</i> durch Calciumionen	108
3.	Einfluß von EGTA, Trifluoperazine und Rutheniumrot auf die Hemmung der Stomata- öffnung durch Calcium	110
4.	Zusammenfassung von Kapitel VII	111
VIII.	Zusammenfassende Diskussion	116
D.	ZUSAMMENFASSUNG	130
E.	LITERATURVERZEICHNIS	132

Verzeichnis der Abkürzungen

ABA	cis-trans-Abscisinsäure
CAM	Crassulacean Acid Metabolism
DCCD	N,N-dicyclohexyl-carbodiimide
DCMU	3(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-dimethyl-harnstoff
2,4-DNP	2,4-Dinitrophenol
EGTA	Ethylenglycol-bis-Aminoethylether-tetraacetat
JAA	Jodacetamid
MDH	Malatdehydrogenase
NaOV	Natriumorthovanadat
NEM	N-ethymaleinimid
PCMBS	p-chloromercuriphenylsulfonat
PEP	Phosphoenolpyruvat
PEP-C	Phosphoenolpyruvat-Carboxylase
PEP-CK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
PMA	Phenylmercuriacetat
RuBP	Ribulosebisphosphatcarboxylase
TFA	Trifluoperazine

A. EINLEITUNG

Seit jeher haben schnelle Bewegungen an den anscheinend unbeweglichen Pflanzen, wie die Schließmechanismen der Insektivoren und die Spaltöffnungsbewegungen, die Forscher fasziniert und interessiert. So nimmt es nicht Wunder, daß bereits im Jahre 1856 der deutsche Botaniker Heinrich von Mohl in der Botanischen Zeitung einen grundlegenden Artikel über die Stomatabewegung veröffentlichte. Über Plasmolyseversuche mit Zuckerlösungen gelangte er zu der Erkenntnis, daß die Schließzellenbewegung die Folge von osmotischen Veränderungen der Stomata sei und legte damit den Grundstein für die moderne Stomataforschung. Die Beobachtung, daß die während der Nacht in den Schließzellenplastiden gebildete Stärke während des Öffnens am Tage verschwindet, führte schließlich Lloyd (1908) zur Formulierung der ersten Stomatafunktionstheorie. Er vermutete in den Schließzellen eine zur Stärkehydrolyse führende lichtstimulierte Enzyminduktion. Die dabei gebildeten Mono- und Disaccharide würden zu einer Erhöhung des osmotischen Potentials führen und das dadurch einströmende Wasser Turgorerhöhung und somit ein Öffnen der Stomata bewirken. Obgleich es nie gelang eine vernünftige Korrelation zwischen Öffnungszustand und Zuckergehalt der Stomata nachzuweisen, konnte sich diese Ansicht doch bis in unsere Zeit halten. Neuere elektrophysiologische Untersuchun-



gen von MacRobbie (1981a) lassen eine zumindest teilweise Beteiligung von Zuckern am osmotischen Potential der geöffneten Schließzellen nicht für völlig unwahrscheinlich erscheinen.

Die Entdeckung des primären Osmotikums beim Öffnen der Stomata gebührt dem Japaner Imamura (1943). Er machte die Beobachtung, daß das Öffnen der Stomata immer von einer Kaliumakkumulation in den Schließzellen begleitet wird. Viele andere Forscher haben diese Erkenntnis durch verfeinerte Methoden bestätigt, so daß heute für fast alle Pflanzen feststeht, daß die Turgorerhöhung der Schließzellen beim Öffnen auf einer Akkumulation von Kaliumionen in diesen Zellen beruht (Hsiao, 1976). Für Commelina communis konnte etwa gezeigt werden, daß der Kaliumgehalt der Schließzellen von 0.095 M im geschlossenen Zustand auf 0.448 M im offenen Zustand ansteigt (Penny und Bowling, 1974; Penny et al., 1976). Ähnliche Verhältnisse fanden sich auch bei anderen Pflanzen; bei einigen konnte unter salinen Verhältnissen sogar eine Beteiligung von Natriumionen nachgewiesen werden (Eshel et al., 1974).

Gleichzeitig mit der Entdeckung des Kaliums als Osmotikum der Schließzellen stellte sich die Frage nach dem Anion der importierten Kaliumionen. Eine einseitige Verschiebung von Kaliumionen bedeutet gleichzeitig eine Ladungsverschiebung und somit eine Membranpotentialveränderung, die den Kaliumtransportprozess schon nach kurzer Zeit zum Erliegen bringen würde. Aus Gründen der Elektroneutralität muß daher entweder gleichzeitig ein Anion mittransportiert werden, oder die Anionen müssen intern bereitgestellt werden. Als naheliegende Erklärung wurde angenommen, daß organische Säuren die Anionen für importiertes Kalium liefern. Alhway (1973) konnte eine Erhöhung des Malatgehalts der Epidermis beim Öffnen der Stomata von Vicia faba feststellen und nahm an,

daß Äpfelsäure als Anion für importiertes Kalium dient. Jüngere Untersuchungen von Travies und Mansfield (1977) und Van Kirk und Raschke (1978) konnten bei Commelina communis Malatgehalte nachweisen, die zur vollständigen Kompensation der importierten Kaliumladungen ausreichen würden.

Da das Malat zum Zwecke des Ladungsausgleichs natürlich als Anion vorliegen muß, wurde schon früh die Vermutung geäußert, daß die Protonen der Äpfelsäure gleichzeitig mit der Kaliumaufnahme aus den Schließzellen exportiert werden müßten. Tatsächlich konnten Raschke und Humble (1973) eine Ansäuerung des externen Milieus beim Öffnen der Stomata von Vicia faba nachweisen und auf einen Protonenexport zurückführen. Der Protonenexport führt zum Aufbau eines negativen Membranpotentials, das ebenfalls nachgewiesen werden konnte (Pallaghy, 1968; Saftner und Raschke, 1981). Auch die Verwendung des Pilztoxins Fusicoccin, das Protonenpumpen stimuliert (Marrée, 1977; Squire und Jones, 1973), beschleunigt das Öffnen der Stomata (Turner, 1973), wodurch indirekt das Vorhandensein einer Protonenpumpe wahrscheinlich gemacht wurde.

Gegen die alleinige Kompensation des Kaliums durch internes Malat tauchten aber schon bald Zweifel auf. So konnte selten ein völlig stöchiometrisches Verhältnis zwischen exportierten Protonen und importierten Kaliumionen gefunden werden (Raschke und Humble, 1973). Auch zeigte sich, daß durchaus nicht bei allen Pflanzen eine positive Korrelation zwischen Öffnungszustand und Malatgehalt gefunden werden konnte (Bowling, 1976). Außerdem verschwand bei vielen Pflanzen die Korrelation zwischen Malat und Öffnungsgrad, wenn Chlorid im Inkubationsmedium vorhanden war (Pallaghy und Fischer, 1974; Raschke und Schnabl, 1978). Es ließ sich dann auch nachweisen, daß der Chloridgehalt der Schließzellen beim Öffnen zunahm

(Outlaw und Lowry, 1974). Für Allium cepa konnten Schnabl et al. (1978) und Schnabl (1978) sogar zeigen, daß fast ausschließlich Chlorid dem Ladungsausgleich für importiertes Kalium dient. Heute besteht allgemein die Ansicht, daß Chlorid bei fast allen Pflanzen je nach Verfügbarkeit als ladungskompensierendes Anion an der Kaliumaufnahme beteiligt ist. Die Chloridionen werden dabei durch einen bislang unbekannten Transportmechanismus, ebenso wie die Kaliumionen, aus dem Apoplasten aufgenommen.

Letztlich werden also beim Öffnen der Stomata Kaliumchlorid und Kaliummalat in unterschiedlichen Verhältnissen akkumuliert.

Zweifel herrschten lange Zeit über die Malatbereitstellungsmechanismen und über die Energieversorgung der Schließzellen. Es konnte zwar schon früh gezeigt werden, daß nur die Schließzellen in der Epidermis in der Lage sind CO_2 zu fixieren (Nishida, 1963; Shaw und MacLachlan, 1954; Willmer et al., 1973), durch Untersuchungen an sorgfältig von Mesophyllzellen befreiten Epidermen von Commelina communis konnten aber Dittrich und Raschke (1977) nachweisen, daß die Schließzellen nicht über den Calvincyclus verfügen und somit nicht autotroph sind. Sie konnten zudem weiter zeigen, daß Kohlenhydrate aus den assimilierenden Mesophyllzellen aufgenommen und nachts in den Plastiden der Schließzellen in Stärke umgewandelt werden können.

Willmer et al. (1973) konnten die CO_2 -Fixierung der Schließzellen als einen CAM-ähnlichen Metabolismus aufklären: Durch Phosphorolyse und Glycolyse der Schließzellenstärke wird Phosphoenolpyruvat gebildet, das mit Hilfe des Enzyms Phosphoenolpyruvat-Carboxylase zu Oxalacetat carboxyliert wird. Dieses wiederum wird mit Hilfe der Malatdehydrogenase

zu Malat reduziert und dies steht dann sowohl als Protonenquelle, als auch als Anion für importiertes Kalium zur Verfügung. Überschüssiges Malat kann über Gluconeogenese wieder in Stärke zurückverwandelt werden (Dittrich und Raschke, 1977; Willmer und Rutter, 1977; Schnabl, 1981).

Über den Abbau der Stärke steht somit ausreichend Energie für Transportprozesse und Gluconeogenese in den Schließzellen zur Verfügung. Daneben läßt sich aber nicht ausschließen, daß auch über Photophosphorylierung in PS I Energiegewinnung möglich ist (Pallas und Dilley, 1972; Schnabl und Hampp, 1980). Die Schließzellen der meisten Pflanzen enthalten grüne Chloroplasten, die in geschlossenem Zustand mit Stärkekörnern gefüllt sind. Die Anzahl der Thylakoide ist jedoch geringer, als bei Mesophyllzellen (Allaway und Setterfield, 1972).

Sehr wenig ist bislang über die Mechanismen des Schließens bekannt. Inwieweit hier metabolische Prozesse verwickelt sind oder ob es sich hierbei vorwiegend um passive Prozesse handelt kann nur vermutet werden. Jedenfalls wird beim Stomataschluß Kalium und Chlorid wieder aus den Schließzellen exportiert. Malat wird wahrscheinlich teilweise ebenfalls exportiert, teils in den Tricarbonsäurecyclus eingeschleust oder über Gluconeogenese wieder zu Stärke umgewandelt.

Große Bedeutung für die Steuerung der Schließzellenbewegung wird auch dem Streßhormon Abscisinsäure beigemessen. Es bewirkt schon in niedriger Konzentration Stomataschluß bzw. verhindert das Öffnen vollkommen (Mittelheuser und Van Steveninck, 1969; Cummins et al. 1973). ABA kann dabei unter osmotischem Streß in den Schließzellen selbst gebildet werden (Weiler et al., 1982). Über die Wirkungsweise

von ABA gibt es nur Hypothesen. So vermutet Raschke (1978), daß die ABA-Wirkung auf einer Blockierung der Protonenpumpe nach dem Entkopplungsprinzip beruht. Van Kirk und Raschke (1978) stellen bei Epidermen von Vicia faba einen erhöhten Efflux von Malat bei ABA-Inkubation fest.

Ein weiterer für die Stomatabewegungssteuerung in Frage kommender Faktor wäre der Einfluß von Calciumionen. Sie bewirken bei vielen Pflanzen ebenfalls Stomataschluß und verhindern ein Öffnen der Schließzellen. Es konnte zwar infolge des Einflusses von Calciumionen eine Ansäuerung des Inkubationsmediums festgestellt und auf einen Ionenaustausch mit Protonen der Zellwand zurückgeführt werden (Raschke und Humble, 1973), doch bleibt der direkte Wirkungsmechanismus vorläufig unklar.

Alle bisher angeführten Ergebnisse lassen sich in einer modellhaften Vorstellung zur Funktion der Stomatabewegung zusammenfassen:

Die aus dem Mesophyll angelieferten niedermolekularen Kohlenhydrate werden in den Chloroplasten der Schließzellen zu Stärke umgesetzt. Auf einer, auf molekularer Ebene bisher nicht näher definierten, durch CO_2 , Wasserversorgung und Licht induzierten Öffnungsstimulus, erfolgt die wahrscheinlich ATP-verbrauchende Kaliumakkumulation in den Schließzellen. Die Primärreaktion liegt dabei offenbar im Aufbau eines negativen Membranpotentials, das durch aktiven Export von Protonen aus den Stomata zustande kommt. Der elektrische Gradient und das Protonendiffusionspotential werden letztlich zum Transport von Kalium- und Chloridionen in die Schließzellen genutzt. Formal erfolgt der Transport dabei entweder als Protonen/Kalium-Antiport oder als Kalium/Chlorid-Cotransport. Als Anion für die über Protonen/Kalium-Antiport in die Schließzellen gelangten Kaliumionen steht internes Malat zur Verfügung, das durch Carboxylierung

von Phosphoenolpyruvat intern gebildet wird. PEP entsteht beim Abbau der Schließzellenstärke. Beim Stomatasyklus ist der umgekehrte Prozeß anzunehmen, Kalium und Chlorid werden wieder hinausbefördert und verteilen sich über den Apoplasten in Neben- und Epidermiszellen. Malat wird z.T. ebenfalls exportiert, z.T. aber auch über die Gluconeogenese oder den Tricarbonsäurecyclus weitermetabolisiert.

Das vorliegende Modell läßt aber noch viele Fragen offen. Insbesondere bestehen noch Unklarheiten über die Bedeutung der unterschiedlichen Beteiligung von Malat und Chlorid am Ladungsausgleich für importiertes Kalium, über die Energieabhängigkeit des Öffnens und Schließens und über die Schließmechanismen, insbesondere im Hinblick auf die physiologische Rolle von Abscisinsäure und Calciumionen.

Die vorliegende Arbeit soll versuchen einige dieser Probleme einer Klärung näherzubringen.

B. MATERIAL UND METHODEN

1. Pflanzenmaterial und Anzucht

Zur Anzucht der Pflanzen wurden Samen von Commelina communis L., Nicotiana rustica und Vicia faba L. verwendet. Tulpenblätter stammten von voll entwickelten, blühenden Freilandtulpen des Botanischen Gartens, München.

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte durch Ankeimen der Samen bei 28°C im Brutschrank. Die oft schwer keimenden Commelinasamen wurden teilweise zur Keiminduktion in einer Lösung von 1 mg Gibberelin und 1 mg Kinetin in 50 ml Aceton für 12 h vorinkubiert und erst dann in den Brutschrank gebracht. Nach 4-7 Tagen wurden die inzwischen ausgekeimten Samen in normale Gartenerde pikiert. Die weitere Aufzucht erfolgte bei 22-25°C im Treibhaus, wobei durch künstliche Beleuchtung mit Hg-Dampflampen die Tageslänge auf 16 h gehalten wurde. Nach 3-5 Wochen waren die Pflanzen soweit entwickelt, daß sie für die Versuche verwendet werden konnten.

2. Epidermispräparation und Inkubationstechnik

2.1. Epidermispräparation

Zur Isolation der Epidermisstreifen fanden jeweils die obersten voll entwickelten Blätter einer Pflanze Verwendung. Die Blätter wurden zu diesem Zweck von der Pflanze abgeschnitten und die gewünschte Epidermisgröße mit einer Rasierklinge auf der Blattunterseite leicht eingeschnitten. Mittels Pinzette läßt sich die Epidermis dann bei jungen Blättern leicht abziehen und kann mit einer, an der Spitze abgknickten Präpariernadel auf die gewünschten Inkubationslösungen übertragen werden.

2.2. Enzymatische Schließzellenisolation

Nach der Isolation der Epidermisstreifen, wurden diese auf eine Lösung von 4 % Cellulysin (Calbiochem), 1 % Serumalbumin (Serva) und 200 mM Mannit in dest. Wasser übertragen. Nach 90 min Inkubation bei 25°C im Schüttler erfolgte für 5 min eine weitere Inkubation auf dest. Wasser. Die inzwischen sehr fragilen Epidermen standen dann für weitere Versuche bereit.

2.3. Ultraschallbehandlung

Zur Ultraschallbehandlung wurden die Epidermisstreifen in ein 50 ml Becherglas mit dest. Wasser gebracht. Die Beschallung erfolgte mittels eines Sonifier B 12 (Branson Sonic Power Company) bei Intensitätsstufe 8 (80 W) über die im Ergebnisteil angegebenen Zeiten.

2.4. Inkubationstechnik

Die Inkubation der Epidermen auf den verschiedenen Lösungen erfolgte in einem thermostatisierten, durchsichtigen Wasserbad aus Plexiglas, das durch 2 Glühlampen (Osram Concentra 300W) im Abstand von 30 cm von unten beleuchtet werden konnte. Die Wasserbadtemperatur betrug, wenn nicht anders vermerkt, 30°C. In das Wasserbad konnten entweder mehrere 10 ml Bechergläser gestellt werden oder zur besseren Temperaturkonstanthaltung ein weiteres separat thermostatisierbares und durchsichtiges Wasserbad mit 6 Einsätzen, je 10 ml, eingesetzt werden.

2.5. Kontrolle der Stomataöffnung

Die Kontrolle der Stomataöffnung erfolgte durch Beobachtung der Epidermisstreifen unter dem Mikroskop in einem Zeitintervall von 15 min (wenn nicht anders vermerkt) und bei einer 100-fachen Vergrößerung. Bei dieser Vergrößerung lassen sich etwa bei Commelinaepidermen ca. 60 Stomata überblicken, so daß auf einen Blick die einheitliche Öffnung der Schließzellen kontrolliert werden kann. Die Messung der Öffnungsweite der einzelnen Schließzellen erfolgt bei 400-facher Vergrößerung mittels Okularmikrometer.

3. Färbemethoden

3.1. Kaliumfärbung

Die Epidermisstreifen werden kurz in eiskaltem Wasser abgespült und dann für 20 min in eine ebenfalls eiskalte Lösung von 1 g Kobaltnitrat ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2$), 1,75 g Natriumnitrit (NaNO_2) in 3,25 ml dest. Wasser und 0.5 ml Essigsäure gebracht. Anschließend kommen die Epidermen für 5 min wieder in eiskaltes Wasser und darauf auf eine wiederum eiskalte 5 %ige Natriumsulfidlösung. Nach dem Klarspülen erscheint dann Kalium als schwarze Färbung von Kobaltsulfid (CoS) und kann unter dem Mikroskop beobachtet werden.

3.2. Chloridfärbung

Die Epidermisstreifen werden kurz in destilliertem Wasser gewaschen und dann für 10 min auf eine 5 %ige Silbernitratlösung übertragen. Nach 5 min Waschen in dest. Wasser kommen die Streifen auf handelsüblichen Photoentwickler (Agfa-Neutol) und verbleiben dort für 3 min. Nach weiterem kurzen Waschen erscheint chloridhaltiges Gewebe infolge des reduzierten Silbers schwarz.

3.3. Neutralrotfärbung

Die Epidermen werden auf eine 10^{-3} %ige wässrige Lösung von Neutralrot übertragen. Bei intakten Stomata sind diese nach 15 min stark rot gefärbt.

4. $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungstechnik

4.1. $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen mit isolierten Epidermen

Die $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen der isolierten Epidermen erfolgten durchwegs in selbstgefertigten Inkubationsröhrchen. Es handelt sich dabei um Glasröhren von ca. 10 mm $\emptyset$ und 5 cm Länge, die an ihren offenen Enden durch Gummistopfen verschließbar sind. Zu Beginn der $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung wurden in das Röhrchen 200 μl der Inkubationslösung eingebracht und die Epidermisstreifen, mit einer vorher bestimmten Fläche von ca. 2 cm^2 , darauf plaziert. Danach wurde das Röhrchen verschlossen und im Wasserbad bei 30°C für 5 min vorinkubiert. Anschließend wurde das Röhrchen wieder geöffnet und 40 μl $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (Amersham) mittels Pipette so in das Röhrchen gebracht, daß sich die beiden Flüssigkeitstropfen nicht berührten. Nach neuerlichem Verschuß des Röhrchens konnten die beiden Flüssigkeitstropfen vereinigt und die $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung im Wasserbad fortgesetzt werden. Die spezifische Aktivität

des $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ betrug 2mCi/ml , die eingesetzte Menge an Radioaktivität daher pro Fixierung $80\text{ }\mu\text{Ci}$. Das Inkubationsmedium enthielt, wenn nicht anders angegeben, 30 mM Citratpuffer und die bei den Ergebnissen angeführte Konzentration an KCl oder Kaliumsulfat. Fixierungen ohne Kaliumsalze wurden durch 30 mM MES (Sigma) abgepuffert. Bei Fixierungen mit Abscisinsäure enthielt das Medium zusätzlich 10^{-4} M cis-trans-ABA (Sigma).

4.2. $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen mit intakten Blättern

Die Blätter wurden an der intakten Pflanze fixiert. Zu diesem Zweck wurde die komplette Pflanze in einer Plastiktüte gasdicht verpackt. Auf dem Pflanztopf befand sich ein Gefäß mit 1 ml Phosphorsäure. Nachdem die so verpackte Pflanze in die Sonne gestellt war, wurde $^{14}\text{CO}_2$ dadurch entwickelt, daß mittels einer Injektionsspritze $200\text{ }\mu\text{l}$ $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (2 mCi/ml) in die Phosphorsäure eingespritzt wurden. Nach 6 h konnte die $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung abgebrochen werden, indem das überschüssige gasförmige $^{14}\text{CO}_2$ durch KOH gebunden wurde. Die Blätter standen dann für weitere Versuche bereit.

4.3. Epidermisinkubation auf ^{14}C -Kohlenhydraten

Diese Inkubationen fanden ebenfalls in den vorgehend beschriebenen Inkubationsröhrchen statt. Das Inkubationsmedium enthielt $200\text{ }\mu\text{l}$ KCl 100 mM . Nach jeweils 5 min Vorinkubation im Wasserbad wurden je nach Versuch folgende Mengen der verschiedenen, markierten Substanzen einpipettiert:

$50\text{ }\mu\text{l}$ ^{14}C -Glucose (Amersham) $\hat{=}$ $10\text{ }\mu\text{Ci}$

$50\text{ }\mu\text{l}$ ^{14}C -Phosphoenolpyruvat (Amersham) $\hat{=}$ $5\text{ }\mu\text{Ci}$

$50\text{ }\mu\text{l}$ ^{14}C -Saccharose (Amersham) $\hat{=}$ $10\text{ }\mu\text{Ci}$

Bei den Dunkelversuchen waren die Röhrchen in lichtundurchlässige Plastikfolien eingewickelt.

4.4. Microradioautographien

Die $^{14}\text{CO}_2$ -fixierten Epidermen wurden unmittelbar aus den Fixierungsröhrchen in heißen Ethanol (70 %ig) gebracht und dort 30 min extrahiert. Anschließend wurden die Epidermisstreifen in Aceton gewaschen, getrocknet und vorsichtig auf einen Klebestreifen aufgeklebt. Dieser Klebestreifen konnte dann in der Dunkelkammer auf einen feinkörnigen Negativfilm (Ilford Pan F) aufgebracht und zwischen Objektträgern gepreßt im Dunkeln 3 Wochen exponiert werden. Werden die Filme anschließend entwickelt, so zeigen sich Ansammlungen von radioaktiv markierter Stärke auf dem Negativ als schwarz gefärbte Stellen.

4.5. Aufarbeitung der ^{14}C -markierten Epidermen

4.5.1. Extraktion der Epidermen

Die ^{14}C -markierten Epidermen werden nach erfolgter Fixierung sofort in 5 ml heißem Ethanol (70 %) für 30 min extrahiert. Zur Messung der Gesamtfixierungsrate werden dem Extrakt 20 μl entnommen und in 5 ml Toluolcocktail (Roth) im Scintillationszähler die Aktivität gemessen. Der verbleibende Extrakt wird anschließend im Luftstrom zur Trockene eingeblasen.

4.5.2. Nachweis der markierten Stärke

Der schon vor dem Einblasen entnommene, extrahierte Epidermisstreifen wird in Aceton gewaschen und zum Nachweis der markierten Stärke in 1N HCl 30 min hydrolysiert. Das Hydrolysat wird anschließend wiederum zur Trockene eingeblasen, der Extrakt in 50 μl Ethanol (50 %ig) aufgenommen und auf Chromatographiepapier (Whatman N° 1) aufgetragen. Gleichzeitig wird auch ein Referenzzuckergemisch mit nicht-radioaktiven Zuckern aufgebracht. Die Trennung der Substanzen erfolgt durch eindimensionale, absteigende Papierchromatographie in einem Ethylacetat-Pyridin-Wassergemisch (100:40:30)

über 16 h. Nach dem Trocknen der Chromatogramme können die identischen Zucker durch Zuckersprühareagenz sichtbar gemacht und mit den durch Abtasten mit dem Zählrohr lokalisierten Substanzen verglichen und identifiziert werden.

4.5.3. Trennung und Identifikation der markierten Extraktverbindungen

Der zur Trockene eingedampfte Epidermisextrakt wird in 50 µl Ethanol (50 %ig) aufgenommen und auf Chromatographiepapier (Whatman N°1) aufgetragen. Die Trennung der Substanzen erfolgte durch zweidimensionale Papierchromatographie, wobei das Laufmittel der ersten Richtung aus Phenol-Wasser-Eisessig-EDTA im Verhältnis 84:16:1:0.1 und das der zweiten Richtung aus Butanol-Wasser (2250:150)/Propionsäure-Wasser (1056:1344) im Verhältnis 1:1 bestand. Die getrockneten Chromatogramme werden anschließend auf Röntgenfilm aufgelegt und 3 Wochen exponiert. Nach der Entwicklung der Filme, lassen sich die dort geschwärzten Stellen auf die Chromatogramme durchzeichnen und die Lage der radioaktiv markierten Substanzen somit festlegen. Die Identifikation der Substanzen erfolgt durch Vergleichschromatogramme; der Anteil der einzelnen Substanzen ergibt sich aus der prozentualen Verteilung der Radioaktivität, die durch Auszählen mit einem Methan-Durchfluß-Zählrohr ermittelt werden kann.

4.5.4. Identifikation der markierten Produkte im Inkubationsmedium

Schwierigkeiten bereitet die Identifizierung der radioaktiv markierten Metaboliten im Inkubationsmedium, da die dort vorhandenen Salze (KCl , K_2SO_4) die Papierchromatographie empfindlich stören. Es wurde daher versucht diese Substanzen durch Elektrophorese zu identifizieren. Die eingedampften

Inkubationsmedien wurden dazu in 100 μ l EtOH (50 %ig) aufgenommen und in einer Eppendorfzentrifuge 1 min abzentrifugiert, wodurch sich ein Teil der Salze infolge ihrer geringen EtOH-Löslichkeit abtrennen ließ. Der Überstand wurde dann zusammen mit identischen Zuckern, organischen Säuren und Aminosäuren auf Chromatographiepapier aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei pH 9.6 mit Triäthylaminpuffer bei ca. 3000V und 50 mA. Die Lage der radioaktiv markierten Substanzen läßt sich wiederum durch Abtasten mit dem Methan-Durchfluß-Zählrohr ermitteln. Die Identifikation der Substanzen geschieht durch Vergleich mit den gleichzeitig aufgetragenen Testsubstanzen, die durch die entsprechenden Sprühreagenzien lokalisiert werden können.

5. Messung von Enzymaktivitäten

5.1. Herstellung des Rohextrakts

Die präparierten Epidermisstreifen werden in einen gekühlten Porzellanmörser gebracht, mit einer Spatelspitze Quarzsand in 3 ml Tris-Puffer pH 8.0 (enthält 0.1 M Tris, 10 mM Mg^{2+} , 10 mM DTE, 1 % PVP) fein zerrieben und durch ein Nylonfilter (Maschenweite 20 μ m) gepreßt. Der so behandelte Rohextrakt wird dann bei 2000 rpm 10 min abzentrifugiert und anschließend über eine G-25-Säule filtriert.

5.2. Ribulosebisphosphat-Carboxylase (EC 4.1.1.39)

RuDP-C wurde durch einen radioaktiven Test gemessen. In einem thermostatisierten (35°C) Inkubationsgefäß befinden sich:

180 μ l Tris-Puffer 0.1 M (enthält 10 mM Mg^{2+} , 10 mM Mercaptoethanol) pH 8.0

50 μ l Rohextrakt

20 μ l RuDP 0.05 M

Die Reaktion wird nach kurzer Temperaturangleichung durch 50 μ l $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ gestartet. Nach jeweils 30 sec. werden insgesamt 6 Proben entnommen und sofort in 200 μ l Trichlor-essigsäure (20 %ig) inaktiviert. Anschließend wird im Scintillationszähler die inkorporierte Radioaktivität gemessen, aus der sich schließlich die Enzymaktivität errechnen läßt.

5.3. Malatdehydrogenase (EC 4.1.1.37)

Das Testgemisch enthält:

1.9 ml Tris 0.1 M pH 8.3 (enthält 10 mM Mg^{2+} , 10 mM Mercaptoethanol)

20 μ l NADH_2 0,05 M

20 μ l Rohextrakt

Nach kurzem Temperaturangleich der Probe wird die Reaktion mit 10 μ l Oxalacetat gestartet und die Extinktionsabnahme bei 340 nm am Photometer verfolgt.

5.4. Malic enzyme (EC 4.1.1.40)

Der Test wurde photometrisch durchgeführt. In jeweils 2 ml Testgemisch befinden sich:

1.92 ml Trispuffer 0.1 M pH 8.3 (enthält 10 mM Mg^{2+} , 10 mM Mercaptoethanol)

20 μ l Rohextrakt

20 μ l Malat 0.1 M

Durch Zusatz von 10 μ l NADP 0.05 M wurde die Reaktion gestartet und der Anstieg der Extinktion am Photometer bei 340 nm verfolgt.

5.5. Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (EC 4.1.1.31)

Der Test wurde photometrisch durchgeführt. In je 2ml Testansatz befanden sich:

1,9 ml Trispuffer 0.1 M pH 8.3 (enthält 10 mM Mg^{2+} ,
10 mM Mercaptoethanol)

20 μ l Rohextrakt

20 μ l $NaHCO_3$ 0.2 M

10 μ l $NADH_2$ 0.05 M

Die Oxidation von $NADH_2$ wurde durch Zugabe von 50 μ l PEP
0.2 M gestartet und die Abnahme der Extinktion bei 340 nm
am Photometer beobachtet.

5.6. Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (EC 4.1.1.32)

Die Enzymaktivität wurde durch einen radioaktiven Ansatz
getestet. In einem thermostatisierten Inkubationsgefäß
befanden sich:

185 μ l Hepes-Puffer 0.2 M pH 7.2

5 μ l $MnCl_2$ 0.6 M

20 μ l ATP 0.3 M

10 μ l Oxalacetat 0.3 M

20 μ l $NaH^{14}CO_3$ 0,3 M

Die Reaktion wird nach 1 min Temperaturangleichung mit
60 μ l Rohextrakt gestartet. Nach jeweils 30 sec. werden ins-
gesamt 4 Proben je 60 μ l entnommen und sofort in 200 μ l
Trichloressigsäure inaktiviert. Die eingebaute Radioakti-
vität wird im Scintillationszähler gemessen.

6. Temperaturabhängigkeit des Öffnens und Schließens

Die Inkubationen zur Bestimmung des Q_{10} -Wertes des Öffnens
und Schließens der Spaltöffnungen wurden in dem bereits be-
schriebenen Wasserbad bei 3,5°C und bei 30°C durchgeführt.
Die Inkubationen bei 3.5°C erfolgten in einem separat
thermostatisierbaren Inkubationsgefäß, das an einem eis-
gekühlten Wasserbadkreislauf angeschlossen war.

Der Q_{10} -Wert gibt die Geschwindigkeitserhöhung einer chemischen, physikalischen oder enzymatischen Reaktion bei Erhöhung der Temperatur um 10°C wieder. Die Höhe des Q_{10} -Wertes erlaubt eine Zuordnung der Reaktion als chemischen, physikalischen oder enzymatischen Prozeß. Die Q_{10} -Werte physikalischer Reaktionen bewegen sich um 1, die chemischer Reaktionen bis etwa 1,8 und die enzymatischer Reaktionen über 2. Der Berechnung des Q_{10} -Wertes liegt folgende Formel zugrunde:

$$Q_{10} = \sqrt[10]{x} \quad \text{wobei gilt:}$$

$$x = \text{Temperaturerhöhungsfaktor: } x = \frac{T_1 - T_2}{10}$$

T_1 = höhere Temperatur in $^{\circ}\text{C}$;

T_2 = niedrigere Temperatur in $^{\circ}\text{C}$

y = Faktor der Reaktionsgeschwindigkeitserhöhung

Als Maß gilt die Öffnungs- bzw. Schließgeschwindigkeit der Stomata in $\mu\text{m}/\text{min}$

$$y = \frac{\mu\text{m} / \text{min } 30^{\circ}\text{C}}{\mu\text{m} / \text{min } 3.5^{\circ}\text{C}}$$

7. Inhibitorversuche und Calciumhemmung

Die Inkubationen fanden ebenfalls in dem schon angeführten Wasserbad statt. Die Inhibitoren und weitere Chemikalien stammten von der Firma Sigma. Die Konzentrationen der verschiedenen Inhibitoren sind im Text angegeben.

C. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

I. Isolierte Epidermen

1. Vergleich des in vivo- und in vitro-Systems

1.1. Funktion von Apoplast und Epidermisgewebe

Da viele der hier beschriebenen Versuche mit isolierten Epidermen durchgeführt werden, erhebt sich die Frage der Relevanz dieser Versuche in Bezug auf das in vivo-System. Die isolierten Epidermen werden ja auf ein Medium transferiert, das weder in der Ionenzusammensetzung, noch in der osmotischen Stärke, den im Blatt herrschenden Verhältnissen entspricht. Dazu einige Betrachtungen grundsätzlicher Art.

Bei Commelina communis, einer monokotylen Pflanze, sind die Spaltöffnungen von sechs Nebenzellen umgeben; dieser Stomatakomples ist wiederum in die relativ großen Epidermiszellen eingebettet. Neben- und Epidermiszellen üben durch ihren Turgor einen Druck auf die Schließzellen aus. Die Schließzellenprotoplasten selbst sind von einer wesentlich dickeren Zellwand umgeben als die der Neben- und Epidermiszellen. Die Zellwand der Schließzellen stellt ebenfalls einen kompartimentierten Raum dar, der oft bei der Betrachtung der Schließzellenmechanismen vernachlässigt wird und bei der Inkubation isolierter Epidermen am ehesten Ver-

änderungen unterworfen sein könnte. Die Zellwände der Stomata besitzen in ihrer Zellulosematrix Pektineinlagerungen (Singh und Srivastava, 1973; Srivastava und Singh, 1972), die durch ihre sauren Gruppen sowohl die hydrophilen Eigenschaften der Zellwand, als auch deren Ionenaustauschfähigkeit für Kationen und Elastizität bedingen (Saftner und Raschke, 1981). Da die Kationen fest an die sauren Gruppen der Polygalakturonsäuren gebunden sind, ist leicht ersichtlich, daß die Zellwand einen Raum mit einem eigenen Potential darstellt. Dieser Raum wird allgemein zum Apoplasten gerechnet. Der osmotische Druck im Apoplasten ist unter anderem pH-abhängig. So führt pH-Erniedrigung, in vivo etwa durch Protonenextrusion aus den Schließzellen, zu einer Erleichterung der Verfügbarkeit der gebundenen Kationen, in vivo vor allem Kaliumionen. Die Aufnahme der Kaliumionen durch die Schließzellen würde dadurch wesentlich erleichtert. Zugleich wäre eine Verbindung zwischen pH-Wert und Zellwandelastizität, etwa durch Lösung bzw. Bindung von Wasserstoffbrückenbindungen einzelner Zellwandkomponenten untereinander, denkbar. Jedenfalls wirken der Öffnung der Schließzellen primär die Elastizität bzw. Rigidität der Stomatazellwand mit ihrem Donnanpotential und erst sekundär der Gewebedruck der Neben- und Epidermiszellen entgegen.

Die Schließzellen allein sind in der Epidermis in der Lage, den umgebenden Turgor, einschließlich der Zellwandrigidität, durch aktive Ionenaufnahmemechanismen zu überwinden und somit eine Öffnung freizugeben. Eine fast dreimal so hohe Ionenpermeabilität der Schließzellenmembran im Vergleich zu Mesophyllzellenmembranen (Saftner und Raschke, 1981) ermöglicht schnelle Ionenaufnahme, aber auch schnelle Ionenabgabe. Die Ionenaufnahme erfolgt aus dem Apoplasten, der wie o.a. einen guten Speicher für Kationen darstellt. Die Verfügbarkeit und Speicherung

von Anionen steigt zwar mit sinkendem pH, ist aber wegen der negativ geladenen Zellwand dennoch schwierig. Speicherräume für Anionen, also z.B. Chlorid, stellen in vivo Neben- und Epidermiszellen dar, während bei in vitro-Versuchen eine ausreichende Anionenversorgung sichergestellt sein muß. Bevor jedoch jetzt auf die durch das in vitro-System bedingten Verschiedenheiten in Bezug zum in vivo-System eingegangen wird, soll noch kurz der Einfluß der biologischen Variabilität des Pflanzenmaterials diskutiert werden.

1.2. Biologische Variabilität isolierter Epidermen

Voraussetzung für die Aussagefähigkeit der Versuche ist ihre Reproduzierbarkeit. Gerade bei isolierten Epidermen sind aber selbst unter gleichen Versuchsbedingungen oft unterschiedliche Ergebnisse zu erhalten. Da dies zum Teil auf den Zustand des Pflanzenmaterials zurückzuführen ist, ist es wichtig, dieses so zu standardisieren, daß eine optimale Reproduzierbarkeit gesichert ist.

Bei den Versuchen zeigte sich, daß besonders das Alter von Pflanze und Blatt einen großen Einfluß auf die Stomatareaktion ausübt. Je älter Pflanze und Blätter waren, desto geringer war die Reproduzierbarkeit. Die kaliumchlorid-induzierte Öffnung der isolierten Epidermen wurde mit zunehmendem Blattalter schwächer und äußerte sich in geringeren Öffnungswerten. Aber auch die Epidermen selbst wurden dünner und fragiler, so daß die Isolierung schwieriger war. Die Turgeszenz alter Epidermen scheint schwächer zu sein, als die junger Epidermen. Auch die Jahreszeit der Aufzucht der Pflanzen hat einen Einfluß auf die Stomatareaktion. Bei Commelina communis z.B. waren die im Winter gezogenen Pflanzen im Hinblick auf die Versuche

weniger geeignet, als die im Sommer bzw. Frühjahr gezogenen. Die hellere Blattfarbe der im Winter gezogenen Pflanzen deutet eventuell auf einen Lichtmangel hin. Weiterhin ist auch der momentane Zustand der Pflanzen wichtig. Gute Wasser- und Lichtversorgung sind Voraussetzung. Optimale Ergebnisse liefern nur voll turgeszente, nicht über einen längeren Zeitraum dunkelgehaltene junge Pflanzen. Selbst wenn alle diese Bedingungen erfüllt sind, ergeben sich auch bei gleichen Versuchsbedingungen noch Streuungen der Ergebnisse. Statistisch gesicherte Ergebnisse setzen daher zahlreiche Kontrollversuche und Versuchswiederholungen voraus.

Durch die Epidermisisolierung und die nachfolgende Inkubation auf verschiedenen Lösungen wird das in vivo-System gestört. Es stellt sich daher die Frage, inwieweit ein solches in vitro-System noch aussagekräftig ist. Um dies zu klären, wurden besonders die Kaliumversorgung bzw. die osmotischen Verhältnisse in isolierten Epidermen untersucht.

2. Nachweis des Kaliums beim Öffnen und Schließen der Stomata in isolierten Epidermen

2.1. Einfluß der Vorinkubationszeit auf die Kaliumfärbung

Zur Untersuchung der Kaliumversorgung isolierter Epidermen dienten Kaliumfärbungen mit Natriumkobaltnitrit. Wie schon lange bekannt, zeigen Epidermen mit geschlossenen Stomata, die vom Blatt isoliert und unmittelbar danach gefärbt wurden, als Färbeprodukt dicke, klumpige schwarze Niederschläge, diffus über die gesamte Epidermis verteilt. Werden dagegen Epidermen mit am Blatt geöffneten Stomata gefärbt, so findet sich vor allem ein dicker Niederschlag in den Schließzellen, während die Neben- und vor allem die Epidermiszellen weit schwächer gefärbt werden (Raschke, 1975). Eine starke Kaliumakkumulation in den geöffneten Stomata ist also nachweisbar.

Es wurden nun frisch isolierte Epidermen mit offenen oder geschlossenen Schließzellen vor der Färbung über längere Zeit in reinem Wasser inkubiert. Es zeigte sich dabei, daß die Färbbarkeit der gesamten Epidermis im Laufe der Inkubation nachläßt und zwar in der Reihenfolge Epidermiszellen, Nebenzellen, Schließzellen. So sind bei offenen Schließzellen nach 30 min Inkubation auf Wasser die Epidermiszellen nur noch schwach, die Nebenzellen mittel, die Schließzellen aber immer noch stark gefärbt. Nach 2 h findet sich aber auch in den Schließzellen nur noch eine schwache Färbung, während Neben- und Epidermiszellen völlig ungefärbt bleiben.

2.2. Einfluß der Kaliumverfügbarkeit im Außenmedium auf die Kaliumfärbung

Da die Stomata durch die Inkubation auf Wasser schließen, lag nahe, Kaliumfärbungen auch mit KCl-inkubierten Epidermen durchzuführen, wobei die Stomata ja offen bleiben bzw. weiter öffnen. Es zeigte sich, daß Epidermen mit offenen oder geschlossenen Stomata, die auf 100 mM KCl inkubiert wurden, ebenfalls in ihrer Kaliumfärbbarkeit nachließen, wobei allerdings die Schließzellen noch länger färbbar waren, als bei den entsprechenden Inkubationen auf Wasser.

Bei Inkubation isolierter Epidermen auf 200 mM KCl im Licht sind die Stomata nach zwei Stunden zwar weit geöffnet, doch entspricht auch hier das Bild der Kaliumfärbung nicht dem isolierter und sofort gefärbter Epidermen mit offenen Stomata. Nur in den Schließzellen war ein geringfügiger Niederschlag feststellbar, Neben- und Epidermiszellen blieben gänzlich ungefärbt.

2.3. Einfluß von Abscisinsäure auf die Kaliumfärbungen

Schließen der Stomata innerhalb weniger Minuten wird bei Epidermen von Commelina communis durch Abscisinsäure katalysiert. Es wurde daher auch die Wirkung von ABA auf die Kaliumfärbbarkeit isolierter Epidermen untersucht. Es zeigte sich, daß frisch isolierte Epidermen mit offenen Stomata, die 5 min auf $ABA\ 10^{-4}M$ inkubiert und danach gefärbt wurden, keine Färbung der Schließzellen mehr aufwiesen. Neben- und Epidermiszellen sind noch gefärbt, doch ist die Färbung ebenfalls geringer, als zu gleicher Zeit ohne ABA-Behandlung.

2.4. Chloridfärbungen

Die Chloridfärbungen bestätigen im allgemeinen die Ergebnisse der Kaliumfärbungen. Auch hier zeigte sich ein deutlicher Unterschied der Epidermisfärbungen zwischen den am Blatt geöffneten und den am Blatt geschlossenen Stomata. Bei ersteren fand sich wiederum ein dicker schwarzer Niederschlag von reduziertem Silber in den Schließzellen, während die geschlossenen Stomata nur schwach gefärbt blieben.

Längere Inkubation der Epidermen sowohl auf Wasser, als auch auf Kaliumchloridlösungen, führten zu schwächeren Färbungen, als direkt vom Blatt isolierte und anschließend gefärbte Epidermen. Allerdings war dieser Effekt schwächer, als bei den vergleichbaren Kaliumfärbungen. Bei Inkubation der Epidermen auf ABA zeigt sich auch bei den Chloridfärbungen ein Nachlassen der Färbbarkeit der gesamten Epidermis, doch war der drastischste Effekt bei offenen Schließzellen zu beobachten. Frisch isolierte Epidermen mit offenen Stomata, die 5 min auf $ABA\ 10^{-4}M$ inkubiert und danach gefärbt wurden, zeigten keine signifikante Färbung der Schließzellen, während die Epidermiszellen noch relativ starke Färbung aufwiesen.

3. Öffnen der Stomata in vitro

3.1. Einfluß der Außenkonzentration auf das Öffnen

Werden Blätter von Commelina communis mit geschlossenen Stomata ins Licht gebracht, so kann nach etwa einer Stunde eine Stomataöffnung von ca. 15-18 μm beobachtet werden. In vitro können die Stomata isolierter Epidermen durch Inkubation auf Kalium-, Lithium- oder Natriumchloridlösung besonders gut zum Öffnen gebracht werden, wobei Natriumchlorid offensichtlich am wirksamsten ist. Öffnungsgeschwindigkeit und Öffnungsweite hängen bei entsprechender Belichtung von der Konzentration der Inkubationslösung ab.

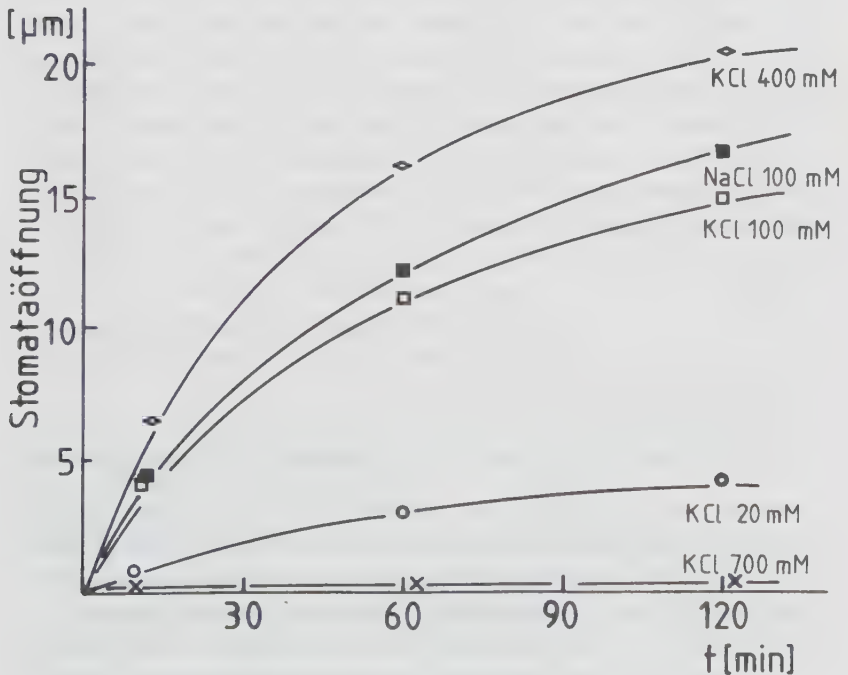


Abb.1:

Einfluß der Ionenkonzentration auf die Öffnungsweite und Geschwindigkeit der Stomata in isolierten Epidermen.

Abbildung 1 zeigt, daß steigende KCl-Konzentration zu einem schnellen und weiteren Öffnen der Stomata führt, wobei mit ca. 400 mM ein Maximum erreicht wird. Die Öffnungsweite der Stomata ist hierbei weiter, als sie normalerweise in vivo erreicht wird.

3.2. Plasmolyse von Epidermis-, Neben- und Schließzellen

Bei einer Konzentration von 400 mM Mannit sind die Neben- und Epidermiszellen bereits voll plasmolysiert. Die Grenzplasmolysekonzentration für Epidermiszellen lag bei etwa 150 mM, die der Nebenzellen bei etwa 200-250 mM. Die Schließzellen selbst waren auch bei 600 mM KCl noch voll turgescent und geöffnet, wenn auch weniger weit, als etwa bei 400 mM. Bei etwa 700 mM öffnen die Stomata nicht mehr, sie bleiben geschlossen und sind plasmolysiert. Werden sie nach etwa 1 h Inkubationsdauer auf 100 mM KCl übertragen, so bleiben sie ebenfalls geschlossen. Wird die Plasmolyse jedoch kurzfristig mit 1 M KCl an frisch isolierten Epidermen mit offenen Stomata durchgeführt, so sind die Schließzellen nach 20 sec. plasmolysiert und geschlossen; werden sie dann auf Wasser übertragen, so öffnen sie innerhalb weniger Sekunden wieder auf den ursprünglichen Öffnungszustand. Kaliumfärbung führt in diesem Fall zu einer positiven Färbung der Stomata.

3.3. Passives Öffnen durch nachlassenden epidermalen Druck

Ähnlich dem "hydropassiven" Effekt, der bei wassergestreßten Blättern zum Öffnen der Stomata führt (Raschke, 1975), kann auch bei isolierten Epidermen ein Öffnen beobachtet werden, wenn Neben- und Epidermiszellen zerstört werden. Werden die isolierten Epidermen mit geschlossenen Stomata etwa kurze Zeit in einem Säurebad bei pH 3 inkubiert, so kann eine Öffnung der Stomata um etwa 7 μ m beobachtet werden.

Die Säurebehandlung führt zur Zerstörung der Neben- und Epidermiszellen. Nach der Isolation von Epidermen von Vicia faba, die sehr fragil sind, zeigt sich auch bei vorher geschlossenen Epidermen immer eine leichte Stomata-Öffnung, die vielleicht auf die Zerstörung eines großen Teils der Epidermiszellen während der Isolation zurückzuführen ist.

4. Schließen der Stomata in vitro

Ein Schließen offener Stomata von frisch isolierten Epidermen läßt sich in vitro durch Inkubation auf Wasser erreichen. Die Stomata schließen in diesem Falle innerhalb etwa 30 min mehr oder weniger vollkommen. Werden die Stomata jedoch in vitro durch Inkubation auf KCl geöffnet oder Epidermen mit offenen Stomata über einige Zeit (30 min) bei niedrigem pH (3.5) und 100 mM KCl inkubiert, so ist die Schließgeschwindigkeit wesentlich verringert und die Stomata schließen nicht mehr ganz, bzw. bleiben im Falle der Säureinkubation sogar über Stunden noch weit geöffnet. Kaliumfärbungen fielen in diesen Fällen vollkommen negativ aus.

5. Zusammenfassung von Kapitel I

Die ersten Versuche haben gezeigt, daß auf den Zustand des Pflanzenmaterial Rücksicht zu nehmen ist. Richtiges Blattalter und entsprechende Pflanzenanzuchtsbedingungen sind Voraussetzung für reproduzierbare Versuche.

Die Kaliumfärbungen zeigen sowohl bei offenen, als auch bei geschlossenen Stomata eine diffuse Färbung in Neben- und Epidermiszellen, wenngleich die Färbung im Falle der offenen Stomata hier etwas schwächer ist. Es deutet darauf hin, daß in der Epidermis verteiltes Kalium, wahrscheinlich aus Nebenzellen und Apoplasten, während des Öffnens der

Stomata in bzw. um die Stomata konzentriert wird. Gemeinsam mit G.Wanner durchgeführte elektronenmikroskopische Untersuchungen an kaliumgefärbten, geöffneten Stomata zeigen nämlich auch einen beträchtlichen Färbeniederschlag in der die Schließzellen umgebenden Zellwand, also im Apoplasten. Werden Epidermen mit geschlossenen Stomata auf Wasser oder ABA inkubiert, so verschwindet die Färbung aus allen Neben- und Epidermiszellen und zeigt somit einen geringeren Kaliumgehalt der Epidermis an. Das läßt darauf schließen, daß ein Leckstrom von Kaliumionen sowohl von Epidermis- und Nebenzellen, als auch vom Apoplasten und den Schließzellen ins Inkubationsmedium gelangt und nicht mehr "recovered" werden kann, mit anderen Worten, die Epidermis verarmt an Kaliumionen. Auch in der Zellwand gebundene Kaliumionen werden offensichtlich ans Medium abgegeben. Ein Öffnen der Stomata findet dann nicht mehr statt, da aktive Turgorerhöhung durch Kaliumaufnahme aus dem Apoplasten nicht mehr möglich ist.

Die Chloridfärbungen lassen auch für Chloridionen ähnliche Verhältnisse erwarten. So weist auch hier die starke Färbung offener Stomata auf eine Konzentrierung der Chloridionen in den Schließzellen hin. Daß dabei tatsächlich Chloridionen für die Färbung verantwortlich sind, zeigt sich an der Tatsache, daß auf K_2SO_4 inkubierte Epidermen weitaus schwächer gefärbte Stomata zeigen, als auf KCl inkubierte Epidermen.

Dagegen kann aus dem geringeren Nachlassen der Färbbarkeit bei längerer Inkubationsdauer auf KCl oder Wasser nicht unbedingt auf einen geringeren Chloridleckstrom geschlossen werden, vielmehr kann dies auch an der unterschiedlichen Empfindlichkeit der beiden Färbeverfahren liegen.

Bei den Kaliumfärbungen und schwächer bei den Chloridfärbungen zeigt sich eigenartigerweise ein Nachlassen der Färbung auch für den Fall, daß die isolierten Epidermen auf 100 mM KCl inkubiert wurden; die Stomata bleiben dann offen bzw. öffnen. Dieses Phänomen deutet darauf hin, daß auch in diesem Fall Kalium und auch Chlorid aus Neben-, Epidermis-, Schließzellen und Apoplasten lecken. Eine der Ursachen dürfte in der hohen Kaliumpermeabilität der Schließzellenmembran zu suchen sein (Saftner und Raschke, 1981), während die im Apoplasten befindlichen Ionen direkt ins Medium entweichen können. Jedenfalls hat der dadurch bedingte nachlassende Gegendruck des umgebenden Gewebes und des Apoplasten die Folge, daß die Stomataöffnung auch durch eine niedrigere Erhöhung des osmotischen Druckes als in vivo erreicht werden kann. Das bedeutet, daß weniger osmotisch aktive Ionen aufgenommen werden müssen, die Kaliumfärbung fällt entsprechend schwach aus bzw. liegt unter der Nachweisgrenze (offensichtlich erfordert der Kaliumcobalt-nitritnachweis relativ hohe Kaliumkonzentrationen). Diese Vermutung wird auch durch die Plasmolyseversuche bestätigt. Sie zeigen, daß Epidermiszellen und Nebenzellen bereits unter 200 mM KCl plasmolysieren, der Druck des epidermalen Gewebes also nachläßt und die Stomataöffnung somit gegen einen geringeren Widerstand erfolgen kann. Höhere Kaliumkonzentrationen führen deshalb auch zu größeren Öffnungsweiten. Ein durch nachlassenden epidermalen Druck induziertes Öffnen kann aber klar von einem aktiven Öffnen unterschieden werden. Wie die Versuche zeigen, wird durch den fehlenden epidermalen Druck nur eine Öffnungsweite von ca. 7 μm erreicht. Die Zellwand allein setzt in diesem Fall der Ausdehnung des Schließzellenprotoplasten noch genügend Widerstand entgegen, um eine weitere Öffnung zu verhindern. Dieser Widerstand kann erst durch weitere Kaliumaufnahme, vielleicht auch verbunden mit einer Erhöhung der Zellwandelastizität, überwunden werden.

Die Versuche zeigen somit deutlich, daß zunehmende Inkubationsdauer der Epidermen zu einer Verarmung der gesamten isolierten Epidermis an osmotisch aktiven Ionen führt. Die Schließzellenöffnung wird in diesem Zustand auf einem niedrigeren osmotischen Niveau erreicht, setzt aber immer noch intakte Ionentransportmechanismen voraus. Die quasi erleichterte Turgorerhöhung zeigt sich auch daran, daß in vitro bei entsprechenden Versuchsbedingungen, viel größere Stomataöffnungen zu erreichen sind als in vivo. Versuche mit langen Inkubationszeiten sollten auf jeden Fall, wegen der Unsicherheit der osmotischen und ionischen Verhältnisse in der Epidermis, vermieden werden.

Der nachlassende Druck des epidermalen Gewebes und des Apoplasten bei längeren Inkubationen und hohen osmotischen Außenkonzentrationen kann jedoch beim Schließen zu Schwierigkeiten führen. Das Schließen der Stomata kann in diesem Falle nur noch durch die Schließzellenzellwandelastizität bewerkstelligt werden. Es wäre aber durchaus denkbar, daß dies keine konstante Kraft darstellt, sondern von den Stomata, etwa durch Protonenextrusion oder Protonenentzug, in gewissem Umfang gesteuert werden kann. Auch drastische äußere Bedingungen, Säurebehandlung etwa, könnten Einfluß auf die Zellwandelastizität nehmen. Vielleicht liegt hierin eine der Ursachen daß offene, säurebehandelte Stomata nicht mehr schließen, selbst wenn sie auf Wasser oder ABA transferiert werden. Ein Nichtschließen offener Stomata muß daher nicht notwendigerweise auf einer Hemmung des Exports osmoaktiver Ionen aus den Schließzellen beruhen, sondern kann seine Ursachen auch in einer Zerstörung der Zellwandelastizität, bzw. des umliegenden Gewebedruckes, als treibende Kräfte des Stomataschlusses haben.

Abschließend läßt sich also sagen, daß mit zunehmender Inkubationsdauer die Aussagefähigkeit der Versuche immer geringer wird, da die in dieser Zeit stattfindenden Änderungen der osmotischen und ionischen Verhältnisse in der Epidermis, keinen Vergleich mit den in vivo-Verhältnissen mehr zulassen. Es wurde daher versucht, die folgenden Versuche mit isolierten Epidermen, möglichst auf Versuchszeiten von unter einer Stunde einzugrenzen.

II. Epidermisreinigung

1. Epidermispräparationen für $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungsversuche und Enzymstudien

Zur Untersuchung des Kohlenhydratstoffwechsels der Schließzellen in isolierten Epidermen dienen einerseits Fixierungsversuche mit radioaktivem Kohlendioxid und Enzymstudien andererseits. Dabei ergeben sich mehrere Probleme. Die Epidermis stellt ein komplexes Gebilde aus Epidermiszellen, Neben- und Schließzellen dar. Es kann mithin nur der gesamte Stoffwechsel der Epidermis erfaßt werden. Ein weiteres Problem sind Kontaminationen der Epidermis mit Mesophyllzellen. Da diese im Gegensatz zu den Schließzellen über den reduktiven Pentosephosphatzyklus und Calvinzyklus verfügen, könnten sie den CO_2 -Fixierungsweg der Schließzellen überlagern und eine kohlenstoffreduzierende Aktivität der Epidermis vortäuschen. Voraussetzung für alle $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen und Enzymstudien mit isolierten Epidermen stellen daher absolut mesophyllzellenfreie Epidermen dar. Mehrere Möglichkeiten bieten sich dazu an:

2. Methoden der Epidermisreinigung

2.1. Wahl des Pflanzenmaterial

Ein relativ einfaches Mittel zur Erreichung sauberer Epidermen besteht in der Wahl des geeigneten Pflanzenmaterials. Nicht alle Pflanzenarten weisen gleich gut isolierbare Epidermen auf, die zudem mit mehr oder weniger großen Mesophyllkontaminationen versehen sind. Zellwanddicke, Kutikulastärke und Wachsauflagerungen spielen überdies eine große Rolle. So besitzt die besonders gut untersuchte Pflanze Vicia faba eine sehr dünne, leicht zerreißende Epidermis, während sich von Tulpenblättern infolge der dicken Wachsauflagerung ohne weiteres große, zusammenhängende Epidermisstücke isolieren lassen. Bei beiden vorgenannten Pflanzen, wie auch bei dem weiter untersuchten Objekt Nicotiana rustica, finden sich aber zahlreiche Mesophyllzellenkontaminationen der Epidermis. Relativ gut geeignet erwies sich die monokotyle Pflanze Commelina communis L. Sie besitzt eine relativ derbe, aber gut und schnell isolierbare Epidermis, die zudem von sehr wenig Mesophyllzellen kontaminiert ist (3-10 Zellen/cm² Epidermisfläche). Voraussetzung sind allerdings junge, voll turgeszente Pflanzen, während die Epidermis alter Pflanzen meist schlecht isolierbar und brüchig ist und zudem mit zahlreichen Kontaminationen behaftet ist. Die wenigen Mesophyllzellen junger Epidermen können unter dem Mikroskop schnell erkannt und mechanisch beseitigt werden. Es stehen somit mit Commelina communis für radioaktive ¹⁴CO₂-Fixierungen und Enzymstudien Pflanzen zur Verfügung, von denen saubere Epidermen in kurzer Zeit präpariert werden können. Da sie zudem ein besonders gut untersuchtes Objekt darstellt, wurde sie auch zu unserer bevorzugten Versuchspflanze.

2.2. Epidermisreinigung durch Ultraschallbehandlung

Die zahlreichen Mesophyllzellen, die den Epidermen von *Tulipa*, *Vicia* und *Nicotiana* anhafteten, wurden zuerst durch Ultraschallbehandlung zu beseitigen versucht. Da die Schließzellen von einer wesentlich dickeren Zellwand umschlossen sind, wäre eine Beschädigung durch Ultraschallbehandlung erst bei längerer Beschallungsdauer und Intensität wahrscheinlich, während die Mesophyllzellen schon vorher zerstört werden müßten. Tatsächlich konnten mit Tabakepidermen nach 30 sec. Beschallungsdauer gute Ergebnisse erzielt werden; es fanden sich danach nur noch etwa 2-3 Mesophyllzellen/cm² Epidermisfläche. Nach dieser Behandlung öffneten noch 60-70 % aller Schließzellen auf KCl 100 mM und nahmen Neutralrot auf, waren also noch weitgehend intakt. Bei *Vicia faba* hingegen führten bereits kurze Beschallungszeiten zur Inaktivierung der Schließzellen bzw. bei längeren Beschallungszeiten (über 45 sec.) zur Auflösung des Epidermiszellverbandes. Sehr stabil erwiesen sich die relativ derben Tulpenepidermen, die auch 60 sec. Ultraschallbehandlung ohne Aktivitätsverlust überstanden, wobei die Epidermen allerdings immer noch nicht ganz kontaminationsfrei waren. Längere Beschallungszeiten führten dann auch hier zur Epidermisschädigung, so daß Neutralrotaufnahme und Öffnen der Schließzellen auf KCl nur noch mäßig waren. Die wenigen verbleibenden Mesophyllzellen der beschallten Epidermen, wie auch der von *Commelina communis* ließen sich dann am besten mechanisch entfernen.

2.3. Mechanische Epidermisreinigung

Am geeignetsten erwies sich das Aufsuchen der Mesophyllzellen unter dem Mikroskop und anschließende Entfernung mittels einer glühenden Präpariernadel. Größere Kontaminationen können teilweise auch durch vorsichtiges Schaben mit der

scharfen Kante eines Deckglases entfernt werden, was sich allerdings nur im Falle der Tulpenepidermen sinnvoll erwies.

Eine weitere meist nicht beachtete Kontaminationsquelle stellen auch Pflanzenhaare dar. Bei Nicotiana rustica z.B. ist die Epidermis von Drüsenhaaren bedeckt. Besonders die Drüsenköpfchen enthalten in großer Zahl grüne Chloroplasten. Fixierungsversuche mit radioaktivem Kohlendioxid konnten zeigen, daß abgeschnittene Drüsenhaare dieses in Stärke einbauten, nach 90 min Fixierungsdauer fanden sich immerhin etwa 15 % der Gesamtfixierungsrate in Stärke. Eine Beeinflussung der prozentualen Verteilung der fixierten Schließzellenmetaboliten muß daher als gegeben angesehen werden. Dieses Problem wurde dadurch zu umgehen versucht, daß die noch intakten Blätter schnell durch die leuchtende Bunsenbrennerflamme gezogen wurden. Die Drüsenhaare wurden dabei zum größten Teil abgesengt, während die Schließzellenaktivität, wie Kontrollversuche zeigten, unbeeinträchtigt blieb.

Bei allen diesen Reinigungsmethoden bleiben die Neben- und Epidermiszellen zumindest zum Teil unbeschädigt. Es kann also bei $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungsversuchen nur die Summe der fixierten Produkte der gesamten Epidermis, also einschließlich der in Neben- und Epidermiszellen transportierten und dort evtl. weitermetabolisierten, markierten Produkte erfaßt werden. Will man den reinen Anteil des Schließzellenmetabolismus erfassen, so müssen die Schließzellen isoliert werden, wofür wieder mehrere Methoden zur Verfügung stehen:

3. Methoden der Schließzellenisolation

3.1. Isolation durch Säurebehandlung und durch mechanische Methoden

Eine sehr alte Methode der Schließzellenisolation (Allaway, 1973) stellt das Überrollen der Epidermis mit gummibezogenen Glasstäben dar. Die Epidermiszellen werden zum Großteil zer-

quetscht, während die stabileren Schließzellen unbeschädigt bleiben. Dies läßt sich bei der nebenzellenfreien Epidermis von Vicia faba relativ gut durchführen, obwohl der Erfolg auch hier nicht quantitativ war. Bei Commelina communis führte die Methode zu schlechten Ergebnissen, da ein Großteil der Nebenzellen unbeschädigt blieb.

Squire und Mansfield (1973) verwendeten zur Isolierung der Schließzellen eine Inkubation der isolierten Epidermen bei niedrigem pH (3.5) über 60 min. Dies bewirkte die Zerstörung der Neben- und Epidermiszellen, während die Schließzellen intakt blieben, was durch Neutralrotaufnahme nachgewiesen werden konnte. Allerdings können durch diese Säurebehandlung Nebeneffekte ausgelöst werden (Dittrich, Mayer und Meusel, 1979), die auch zu einer Störung des Metabolismus führen können. Auch eine Beeinträchtigung der Membraneigenschaften, sowie eine Änderung der Ionenaustauschkapazität der Zellwand kann nicht ausgeschlossen werden. Jedenfalls fand sich nach längerer Säureinkubation nur noch schwaches kaliuminduziertes Öffnen.

3.2. Enzymatische Schließzellenisolation

Eine bessere Methode der Schließzellenisolierung stellt die Bereitung von Schließzellenprotoplasten dar. Besonders von Zeiger und Hepler (1976) und Schnabl et al. (1978) wurden diese Methoden angewandt und verfeinert. Mit Hilfe von Cellulasen werden dabei die Zellwände der Epidermis enzymatisch abgebaut. Da die relativ dicken Zellwände der Schließzellen von den Zellulasen nicht so schnell abgebaut werden können, wie die wesentlich dünneren der Neben- und Epidermiszellen, treten die Nebenzellen- und Epidermiszellenprotoplasten wesentlich früher aus, als die Schließzellenprotoplasten, die dadurch isolierbar werden. Die Schließzellenprotoplasten

müssen in einer relativ hochkonzentrierten Mannitlösung (600 mM) osmotisch im Gleichgewicht gehalten werden. Zur Membranstabilisierung sind dem Inkubationsmedium Calcium und Magnesium zugesetzt. Die so gewonnenen Schließzellenprotoplasten verfügen offenbar noch über funktionierende Ionenaufnahmemechanismen, da z.B. durch Kaliumionen ein Schwellen der Protoplasten erfolgt, während ABA zu Volumenabnahme führt (Schnabl, 1978).

Nachteilig scheint jedoch die lange Isolierdauer (mindestens 4 h bei Vicia faba; die dicke Epidermis von Commelina communis würde noch längere Inkubationsdauer erfordern), das Fehlen des evtl. für Ionenaufnahmemechanismen notwendigen Ionenaustauschers Zellwand und die notwendige hohe osmotische Außenkonzentration. Bei dieser Konzentration befindet sich das osmotische System Schließzellenprotoplast-Außenmedium in einem Gleichgewichtszustand. Jede, auch nur geringe Änderung der Außenkonzentration, bedingt eine Volumenänderung des Protoplasten, da der stabilisierende Gegendruck der Zellwand fehlt. Dies macht Untersuchungen, etwa mit unterschiedlichen Elektrolytkonzentrationen sehr schwierig, zudem ist auch die Beobachtung der evtl. stattfindenden Volumen- bzw. abnahme der Schließzellenprotoplasten mit großen statistischen Fehlern behaftet, da nur die Durchmesserzu- bzw. abnahme gemessen werden kann und diese relativ gering bleibt.

Weiters könnte sich die Anwesenheit von Calciumionen im Medium besonders bei Commelina communis störend auswirken, da auch eine Beeinflussung des Schließzellenmetabolismus nicht ausgeschlossen werden kann (siehe auch Kapitel Calciumwirkung).

Um diesen evtl. störenden Effekt zu umgehen, wurde für einige Versuche ein etwas vereinfachtes und schonenderes Verfahren ausgearbeitet, das ebenfalls auf dem Prinzip der

enzymatischen Zellwandlyse beruht. Die isolierten Epidermen werden anfangs ebenfalls in 4 % Cellulysin im Schüttler inkubiert. Im Medium befanden sich lediglich noch 1 % Serumalbumin zum Schutz vor Proteasen, sowie 200 mM Mannit zur Verhinderung eines größeren Metabolitenefflux. Nach 50 min waren die Epidermiszellenprotoplasten ausgetreten. Nach kurzer Inkubation in dest. Wasser, bei der auch die letzten noch anhaftenden Nebenzellenprotoplasten zerplatzten, erhielt man eine zwar fragile, doch zusammenhängende Epidermis, die nur noch Schließzellen enthielt. Die verdickte Zellwand der Schließzellen ist zwar sicher auch angegriffen, aber nicht soweit, daß die Protoplasten austreten. Die Ionenaustauschfähigkeit der Zellwand sollte zumindest z.T. noch erhalten sein. Diese Epidermis besitzt weiter den Vorteil, daß die Schließzellen auch bei niederen osmotischen Außenkonzentrationen, etwa 100 mM KCl, inkubiert werden können. Weitere Vorteile sind die kurze Inkubationszeit (90 min) und vor allem die Tatsache, daß ohne Membranstabilisatoren, wie Calcium- und Magnesiumionen, inkubiert werden kann, wobei ja Calcium bei Commelina communis eine Öffnungshemmung bewirkt. Weiters läßt sich für Öffnungsversuche die "Restepidermis" unter dem Mikroskop schnell durchmustern, die Öffnungsweite ist anhand des Porus, wie bei normalen Epidermen leicht zu kontrollieren.

3.3. Kontrollversuche mit enzymatisch lysierten Epidermen

Die 90 min cellulysininkubierten Epidermen zeigen gegenüber den mechanisch gereinigten Epidermen vergleichbare äußere Eigenschaften. Es zeigt sich allerdings nach der Cellulysinbehandlung, daß die Stomata bereits etwas geöffnet sind. Dies ist wahrscheinlich auf einen passiven Effekt zurückzuführen, der auf dem Fehlen des epidermalen Gewebedrucks beruht.

Werden die Epidermen mit den isolierten Schließzellen auf Wasser inkubiert, so ist nach 1 h keine weitere Öffnung zu beobachten. Bei gleichzeitiger Zugabe von Neutralrot sind die Schließzellen nach 10 min stark rot gefärbt, was damit auf eine unbeschädigte Schließzellenmembran hinweist.

Auch die Ionenaufnahmemechanismen und somit letztlich die Kaliumakkumulation scheinen unbeeinflusst, da nach 90 min Inkubationszeit auf KCl 100 mM eine Stomataöffnung von 13-16 μm zu beobachten ist, wenngleich etwa 30 % der Schließzellen nicht weiter öffnen. Durch Inkubation auf Mannit 200 mM ist diese Öffnung nicht zu erreichen. Auf Kaliumsulfat 100 mM läßt sich nur eine schwache Öffnung erreichen. Kaliumfärbungen von Epidermen mit geöffneten isolierten Schließzellen zeigen nur eine schwache Präzipitation des Färbereagenzes und ähneln damit den über längere Zeit auf 100 mM KCl inkubierten mechanisch gereinigten isolierten Epidermen. Dies deutet auch in diesem Falle auf einen hohen Efflux hin. Die Stomataöffnung ist auch infolge des fehlenden epidermalen Gewebedruckes durch eine geringere Erhöhung des osmotischen Wertes zu bewerkstelligen, als in vivo.

Die Reaktivität der enzymatisch lysierten Epidermen gegenüber ABA ist jedoch schwächer und langsamer, als bei unbehandelten. Dies ähnelt der Reaktion mechanisch gereinigter Epidermen, die vor der ABA-Behandlung längere Zeit auf Wasser oder KCl vorinkubiert waren (s. Kapitel Abscissinsäure). Es kann vermutet werden, daß wiederum der fehlende epidermale Gewebedruck für diese Reaktion verantwortlich ist.

4. Zusammenfassung von Kapitel II

Anhaftende Mesophyllzellen bei isolierten Epidermen können bei $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungsversuchen und Enzymstudien zu einer Verfälschung des Schließzellenmetabolismus führen. Geringe Mesophyllkontaminationen finden sich bei jungen Epidermen von Commelina communis, die zudem leicht mechanisch zu entfernen sind. Die Pflanze erscheint daher für solche Versuche besonders geeignet.

Soll nur der ausschließliche Schließzellenmetabolismus erfaßt werden, so müssen die Stomata isoliert werden. Es wird ein Verfahren auf enzymatischer Grundlage beschrieben, das isolierte Schließzellen in einer noch zusammenhängenden "Restepidermis" liefert. Die so gewonnenen Epidermen haben im Verhältnis zu normal isolierten Epidermen noch vergleichbare Eigenschaften.

III. $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen

Obgleich der Kohlenhydratstoffwechsel der Schließzellen in der Vergangenheit vielfach untersucht wurde (Shaw und MacLachlan, 1954; Willmer et al., 1973; Willmer und Dittrich, 1974; Raschke und Dittrich, 1977; Schnabl und Ziegler, 1977) verblieben doch noch einige Zweifel, etwa über die Beteiligung von Äpfelsäure am Ladungsausgleich für importiertes Kalium, über den Efflux der Metaboliten oder über den Einfluß der Abscisinsäure auf den Schließzellenmetabolismus. Durch $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungsversuche sollte versucht werden, einige dieser Zweifel auszuräumen.

1. Einfluß verschiedener Puffer auf die $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen

Die $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen mit isolierten Epidermen erfolgten durch Einspritzen einer wässrigen Lösung von $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ in das entsprechende Inkubationsmedium. Bei entsprechend gewählter spezifischer Aktivität an $^{14}\text{CO}_2$ lassen sich relativ hohe ^{14}C -Fixierungsraten in der Epidermis erzielen, obwohl ja nur wenig fixierende Zellen zur Verfügung stehen. Andererseits bedeutet eine Zugabe von NaHCO_3 bis zu einer Endkonzentration von 5 mM im Medium einen pH-Sprung bis auf pH 8.5 - pH 9.5. Dieser hohe pH könnte evtl. zu einer unphysiologischen Änderung der Fixierungskinetiken, etwa durch Veränderung von Enzymaktivitäten und zu Änderungen der Eigenschaften von Plasmalemmamembran und Zellwand führen. Um krasse pH-Verschiebungen zu vermeiden, wurden die Inkubationsmedien daher z.T. abgepuffert.

Da eine Beeinflussung des Öffnungsverhaltens der Stomata durch die Puffer nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden zuerst Kontrollversuche mit verschiedenen Puffern durchgeführt. Getestet wurde jeweils der Einfluß von 20 mM Puffer, pH 5.8, im Inkubationsmedium (bei dieser Pufferkonzentration bleibt der pH-Wert im Inkubationsmedium nach der Natriumhydrogenkarbonatzugabe bis zu einer Endkonzentration von 5 mM im Medium unter pH 7.5) auf das Öffnungsverhalten der Stomata bei Inkubation der Epidermen auf 100 mM KCl. Zur Verwendung kamen Natriumacetatpuffer, Kaliummalatpuffer, Kaliumcitratpuffer und MES-Puffer. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2 dargestellt.

Es zeigte sich, daß Natriumacetatpuffer einen stark hemmenden Effekt auf das KCl-induzierte Öffnen der Stomata von Commelina communis ausübte, auch Kaliummalatpuffer wirkte leicht hemmend. MES beeinflusste das Öffnen der Stomata nicht,

während Kaliumcitratpuffer sogar eine leichte Förderung der Öffnung bewirkte. Dieses Bild wurde bestätigt durch die Inkubation der isolierten Epidermen auf 50 mM reinem Puffer. Im Falle von MES und Natriumacetatpuffer blieben die Stomata geschlossen. Kaliumcitratpuffer bewirkte nach 60 min eine Öffnung von 8-10 μm , Kaliummalatpuffer eine Öffnung von 4-6 μm . Die Abscisinsäurewirkung wurde von keinem Puffer beeinträchtigt; offene Stomata in direkt vom Blatt isolierten Epidermen schlossen sofort.

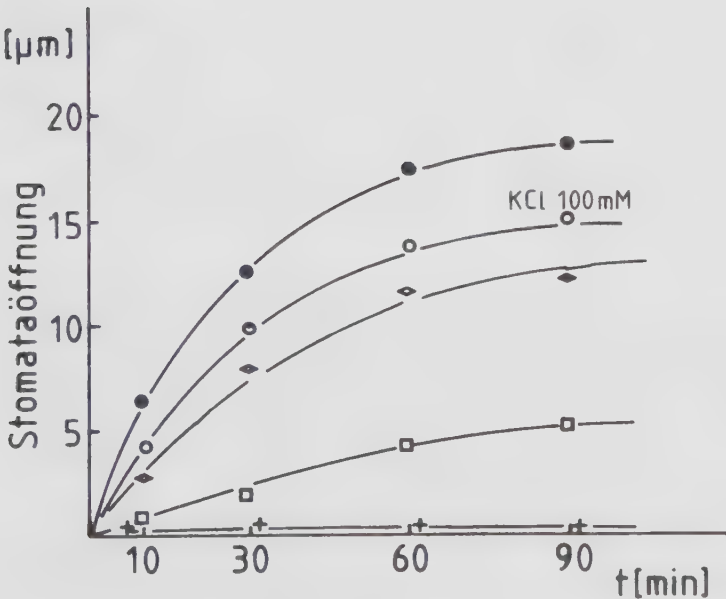


Abb. 2:

Einfluß von verschiedenen Puffern auf das KCl-induzierte Öffnen der Stomata von *Commelina communis* (● KCl 100 mM + 20 mM Citratpuffer; ○ KCl 100 mM + 20 mM MES; ◇ KCl 100 mM + 20 mM Kaliummalatpuffer; □ KCl 100 mM + 20 mM Natriumacetatpuffer; + KCl 100 mM + Puffer + ABA 10^{-4} M).

Bei Kaliumcitrat und Kaliummalatpuffer stehen gleichzeitig Kaliumionen zur Verfügung, worauf die Stomataöffnung bei diesen beiden Puffern zurückzuführen sein dürfte. Wegen der leicht öffnungsfördernden Wirkung des Kaliumcitratpuffers wurde vorwiegend dieser verwendet. Für kaliumfreie Medien fand MES Verwendung. Die öffnungsfördernde Wirkung von Citrat wurde von Raschke (1979) in Verbindung gebracht mit seiner calciumkomplexierenden Wirkung, doch scheint dies fraglich, da eigene Versuche mit anderen Calciumkomplexoren keine Öffnungsförderung zeigten (s. Kapitel Calciumwirkung).

2. Einfluß der Natriumhydrogenkarbonatkonzentration auf die ¹⁴CO₂-Fixierungen

Einen weiteren hemmenden Effekt auf die Stomataöffnung kann die Natriumhydrogenkarbonatkonzentration im Fixierungsmedium ausüben. Es ist ja lange bekannt (Meidner und Mansfield, 1968), daß hohe CO₂-Konzentrationen bei fast allen Pflanzen zum Schließen führen.

Die Endkonzentration an Natriumhydrogenkarbonat betrug bei den meisten Versuchen etwa 5 mM. Kontrollversuche ergaben, daß bei dieser Konzentration die Öffnungsweiten der Stomata nur wenig unter denen lagen, die auf normalem Medium, also ohne Bikarbonatzugabe, inkubiert wurden. Höhere Konzentrationen als 5 mM führten dann allerdings zu stärkeren Öffnungshemmungen, wie aus Abbildung 3 ersichtlich ist.

Die vorangegangenen Versuche zeigen also, daß weder die Cellulysinbehandlung, noch die Puffereinwirkung, noch die Bicarbonatkonzentration das kaliuminduzierte Öffnen in nennenswertem Umfange stören. Damit kann als wahrscheinlich gelten, daß auch die Ionenaufnahmemechanismen und die damit in Zusammenhang stehenden Stoffwechselmechanismen relativ unbeeinträchtigt sind. ¹⁴CO₂-Fixierungen mit diesem

System könnten daher mit guter Wahrscheinlichkeit einen Einblick in die in vivo-Verhältnisse geben.

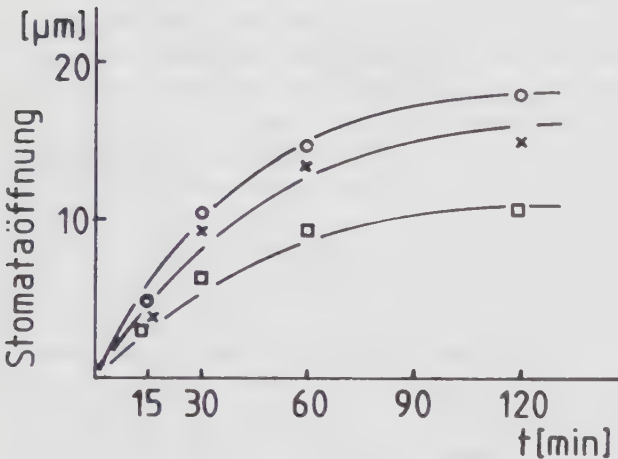


Abb.3:

Einfluß der NaHCO_3 -Konzentration auf das Öffnungsverhalten von Commelina communis (o – KCl 150 mM; x – KCl 150 mM + 5 mM NaHCO_3 ; □ – KCl 150 mM + 20 mM NaHCO_3).

3. Metabolitenaustausch zwischen Neben- und Epidermiszellen und den Schließzellen

3.1. $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen gereinigter und enzymatisch behandelter Epidermen

In zahlreichen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß in der Epidermis ausschließlich die Schließzellen CO_2 -fixierende Aktivität besitzen (Willmer, Pallas, Black, 1973; Willmer und Dittrich, 1974; Raschke und Dittrich, 1977). Es

besteht die Möglichkeit, daß, besonders bei längeren Fixierzeiten, Metaboliten aus den Schließzellen in Neben- und Epidermiszellen transportiert werden könnten und dort zu Produkten weitermetabolisiert werden, die für den Schließzellenstoffwechsel uncharakteristisch sind. Dies sollte sich durch die cellulysinbehandelten Epidermen, die ja nur isolierte, intakte Schließzellen besitzen, nachweisen lassen. Unterschiedliche Verteilung der radioaktiv markierten Produkte zwischen enzymatisch und mechanisch behandelten Epidermen könnte auf Stoffaustausch zwischen Schließzellen und Nebenzellen bzw. Epidermiszellen hinweisen.

Zum Vergleich wurden $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen mit mechanisch gereinigten und 90 min cellulysinbehandelten Epidermen durchgeführt. Die maximale Fixierzeit betrug 45 min, als Inkubationsmedium diente 150 mM Sorbit mit 30 mM Kaliumcitratpuffer. Die Ergebnisse zeigt Abb.4. Es fällt auf, daß die Gesamtfixierungsraten der cellulysinbehandelten Epidermen signifikant niedriger lagen, als die der mechanisch gereinigten Epidermen. Der Vergleich der prozentualen Verteilung der radioaktiv markierten Produkte zeigt dagegen keine signifikanten Unterschiede. Wie Tabelle 1 zeigt, fanden sich als Hauptfixierungsprodukte beider Epidermen in der Hauptsache die organischen Säuren Malat und Citrat, weiters die Aminosäuren Glycin, Serin, Asparaginsäure und Glutaminsäure, sowie die Zucker Saccharose, Maltose und Fructose. Ein ebenfalls EtOH-unlöslicher Anteil konnte durch Hydrolyse als Stärke nachgewiesen werden. Auch in diesem prozentualen Stärkeanteil unterschieden sich die beiden Epidermen nicht.

Die geringen Unterschiede in der Produktverteilung zeigen nochmals, daß die $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung tatsächlich nur in den Schließzellen stattfindet. Weiter, daß es zwischen Schließ-

zellen, Nebenzellen und Epidermiszellen während des Öffnens und innerhalb einer kurzen Zeitspanne nur relativ geringen Stoffaustausch gibt bzw. nur wenig umgesetzt wird. Daß die Gesamtfixierungsrate der enzymatisch behandelten Epidermen niedriger liegt, mag teilweise an einer Inaktivierung einzelner Schließzellen (s. Kapitel Epidermisreinigung), teilweise aber auch an einem erhöhten Apoplastenefflux liegen.

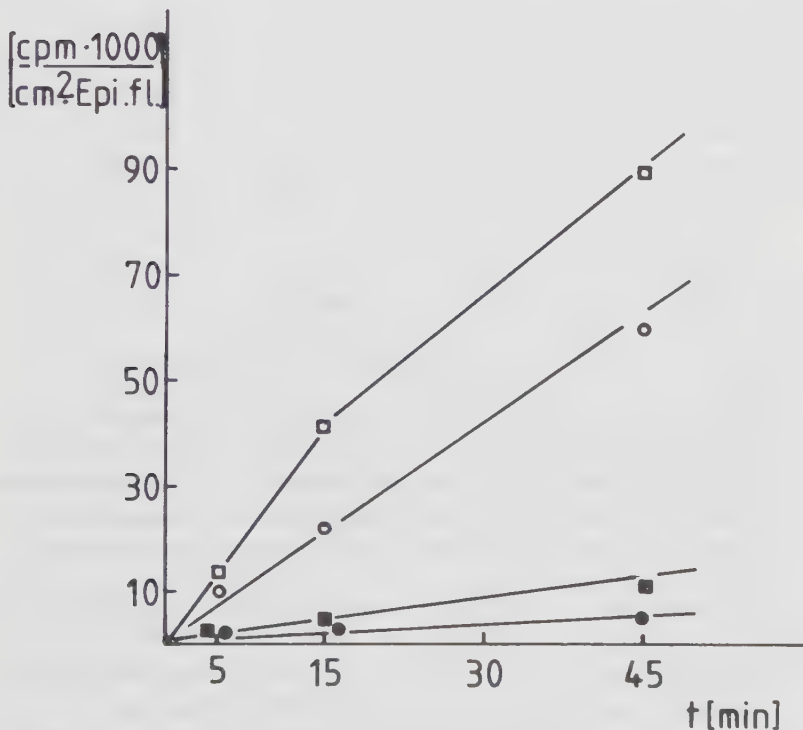


Abb. 4:

Gesamtfixierungsraten mechanisch gereinigter isolierter Epidermen (□—Gesamtfixierungsrate; ■—Stärkeanteil) und 90 min cellulysinbehandelter Epidermen (○—Gesamtfixierungsrate; ●—Stärkeanteil) von Commelina communis im Licht.

Tab.1: CO₂-Fixierungsprodukte mechanisch gereinigter und cellulysinbehandelter Epidermen von Commelina communis.
Relative Verteilung der Produkte in %.

	mechanisch gereinigt	cellulysinbehandelt
Malat	35	38
Citrat	5	7
Glycin/Serin	13	12
Aspartat	2	2
Glutamat	4	6
Saccharose	16	13
Fruktose	8	9
Stärke	9	8

3.2. Autoradiographien isolierter Epidermen

Weitere Bestätigung der obigen Ergebnisse konnten durch Autoradiographien mechanisch gereinigter, isolierter Epidermen erhalten werden. Gefriergetrocknete Epidermen, die vorher 2 h radioaktivem ¹⁴CO₂ ausgesetzt waren, zeigten in ihren Autoradiographien deutlich geschwärzte Flecken nur im Bereich der Schließzellen und weisen damit ebenfalls auf einen geringen Stoffaustausch der Schließzellen mit ihrer Umgebung hin.

Die vorangegangenen Versuche zeigen deutlich, daß durch Epidermis- und Nebenzellen keine oder doch nur eine sehr geringe Beeinträchtigung der Schließzellenfixierungsmuster stattfindet. Die folgenden Versuche wurden daher mit mechanisch gereinigten oder mit nur kurz (40 min) enzymatisch behandelten Epidermen durchgeführt.

4. Gluconeogenese

4.1. Herkunft der Zucker in den Schließzellen und Weg der ^{14}C -Markierung der Zucker in isolierten Epidermen

Was bei den vorangegangenen Fixierungen auffällt, ist die Anwesenheit verschiedener Zucker und Stärke, obwohl ja nachgewiesen ist (Raschke, 1979), daß die Schließzellen keinen Calvinzyklus besitzen. Es wird daher angenommen, daß die Markierung der Zucker über den Biosyntheseweg der Gluconeogenese stattfindet (Dittrich und Raschke, 1977; Willmer und Rutter, 1977). Die Markierung in den Zuckern ist dann nicht der Ausdruck einer Nettokohlenstoffixierung, da ja das Primärfixierungsprodukt Malat im Verlauf der Gluconeogenese wieder decarboxyliert wird. Das primär C-4-markierte Malat kann jedoch durch Austausch mit Fumarat im Citronensäurezyklus in der C-1-Position markiert werden, wodurch über die Gluconeogenese radioaktiv markierte Zucker gebildet werden.

4.2. Lichtabhängigkeit der Gluconeogenese

Die Bedeutung der Gluconeogenese für die Schließzellen könnte u.a. in vivo darin liegen, daß während des Öffnens akkumuliertes Malat beim Schließen der Stomata wieder in Stärke zurückverwandelt wird. Es müßte dann bei Belichtung der Epidermen die Gluconeogeneseaktivität geringer sein als bei Dunkelheit, da dann ja als Ladungsausgleich mehr Malat benötigt wird.

Als Versuch bot sich die Inkubation der Epidermen auf KCl im Licht und bei Dunkelheit an. Während ja bekanntlich die belichteten Epidermen von Commelina communis auf KCl 100 mM öffnen, bleiben sie im Dunkeln auf KCl 100 mM weitgehend geschlossen. Die $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen wurden auf KCl 50 mM in 30 mM Kaliumcitratpuffer sowohl im Licht, als auch bei

Dunkelheit durchgeführt. Dabei zeigte sich, wie auch schon von Raschke und Dittrich (1977) beobachtet, kein signifikanter Unterschied in den Gesamtfixierungsraten der belichteten und unbelichteten Epidermen (Abb.5). Dies verwundert zunächst auch nicht, da ja der Calvinzyklus fehlt. Während aber die dunkelgehaltenen Epidermen vorwiegend Malat, Citrat, Aspartat etc. bildeten, waren in den belichteten Epidermen

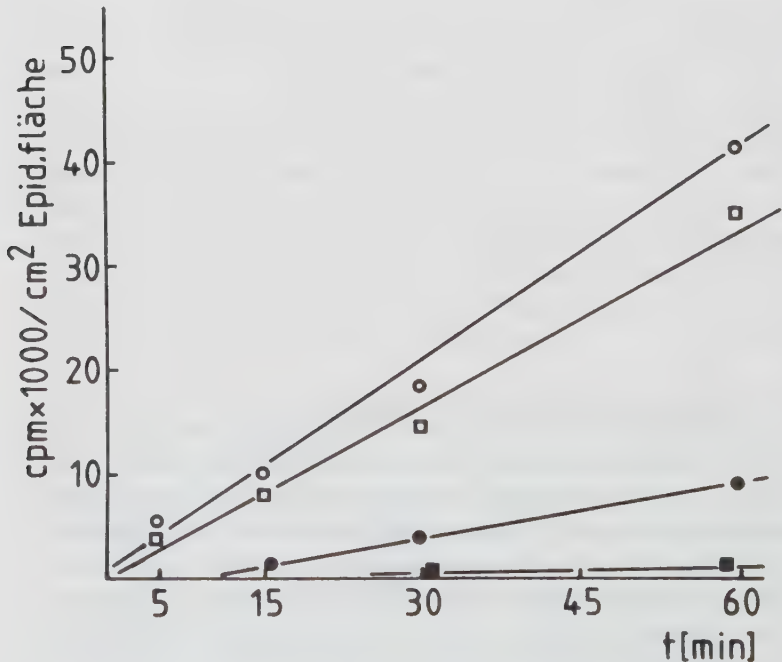


Abb.5:

Gesamtfixierungsraten isolierter Epidermen von Commelina communis im Licht und im Dunkeln (Gesamtfixierungsrate Licht — o; Dunkel — □ ; Stärkeanteil Licht —●; Dunkel — ■)
Inkubationsmedium KCl 50 mM + 30 mM Kaliumcitratpuffer.

deutliche Markierungen auch in Saccharose, Fructose und Stärke nachzuweisen (Abb.6).

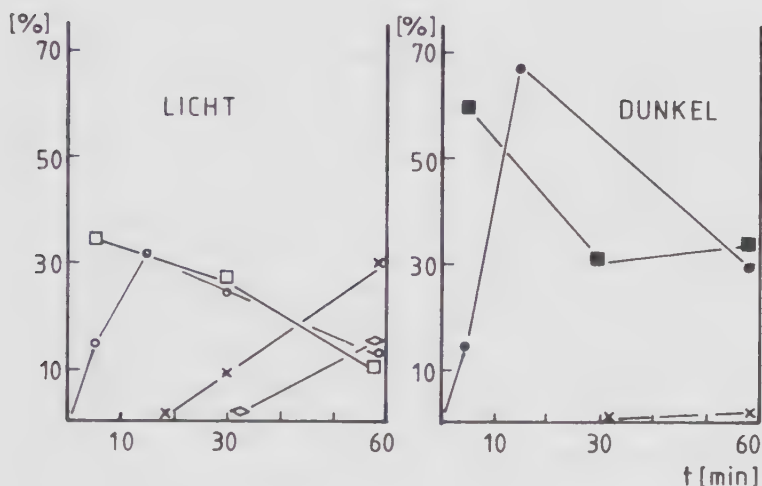


Abb.6:

$^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungsprodukte im Dunkeln und im Licht bei Commelina communis. Relative Verteilung der Radioaktivität in %: ■—Malat; ●—Citrat; X—Saccharose; ◇—Fructose.

Interessant ist, daß die Gluconeogenese im Dunkeln nicht oder doch nur sehr gehemmt abläuft, obgleich in den Schließzellen von intakten Blättern gerade dann der Stärkeaufbau in den Chloroplasten stattfindet (Outlaw und Manchester, 1979). Dies muß aber nicht widersinnig sein, da Dittrich und Raschke (1977) gezeigt haben, daß die Schließzellen vom Mesophyll aus mit Photosyntheseprodukten, wie z.B. Saccharose, versorgt werden und diese dann auch nachts in Stärke umgewandelt werden können. Dies ließ sich auch durch Inkubation der Epidermen mit radioaktiv markierten Kohlenhydraten in der Dunkelheit bestätigen.

Dazu wurden die isolierten Epidermen auf ^{14}C -markierter Saccharose, Glucose und Phosphoenolpyruvat in 100 mM Sorbit inkubiert. Die Versuche wurden im Licht und im Dunkeln durchgeführt.

In Abb. 7 sind die Ergebnisse zusammengefaßt. Nach 45 min fand sich bei der ^{14}C -Saccharose-Inkubation etwa die Hälfte der gesamten Radioaktivität in der Stärke, bei der ^{14}C -Glucose-Inkubation etwa ein Drittel und bei der ^{14}C -Phosphoenolpyruvat-Inkubation etwa 10 %. Licht- und Dunkelinkubationen zeigen in etwa die gleichen Ergebnisse.

Das bedeutet in Bezug auf die fehlende Markierung der Zucker während der Dunkelpase, daß der enzymatische Schritt von Malat zum Phosphoenolpyruvat gehemmt ist. Das hat zur Folge, daß bei den $^{14}\text{CO}_2$ -Dunkelfixierungen in der Hauptsache organische Säuren markiert und somit auch akkumuliert werden. Der Vorgang ähnelt damit der Dunkelpase beim Crassulaceanstoffwechsel.

Abb. 7:

Einbauraten markierter Vorläufer bei Inkubation der isolierten Epidermen von Commelina communis auf ^{14}C -Saccharose, ^{14}C -Glucose und ^{14}C -PEP im Licht und im Dunkeln (o— Gesamtfixierungsraten, ●— Stärkeanteil).

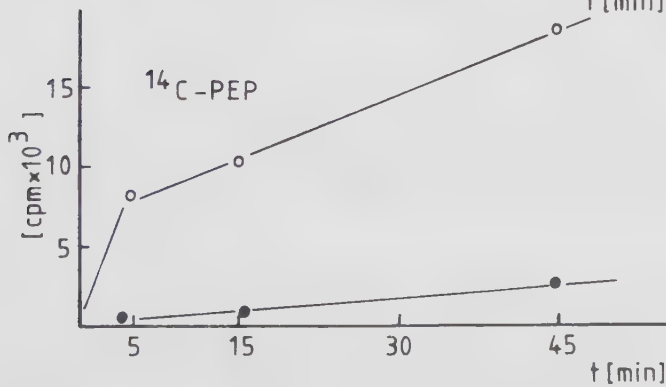
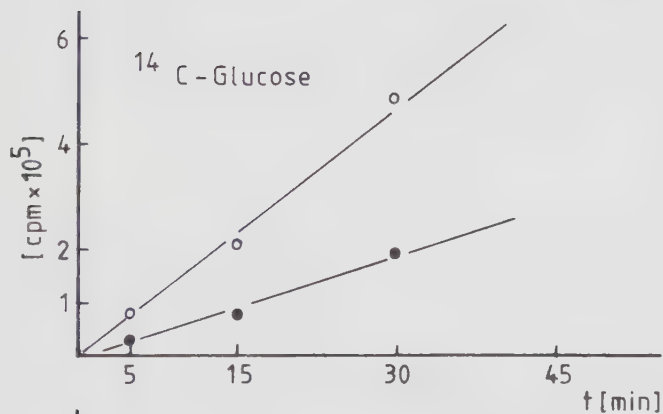
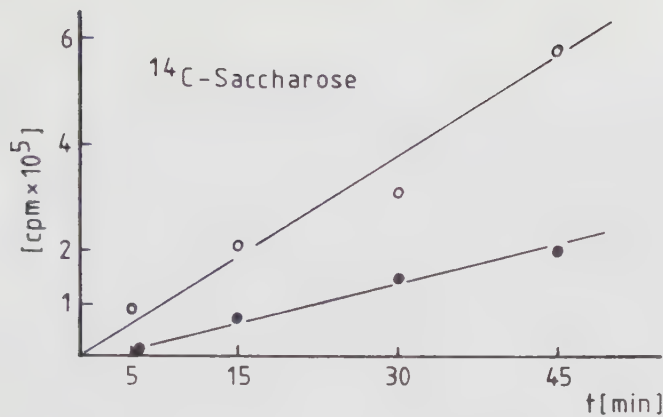


Abb. 7

Diese Art der Dunkelfixierung ist nicht nur auf die Epidermen von Commelina communis beschränkt, auch hochgereinigte Tulpenepidermen zeigen dieses Phänomen. Wie die Abbildungen 8 und 9 zeigen, sind die Gesamtfixierungsraten im Licht, wie auch im Dunkeln etwa gleich hoch, aber im Gegensatz zur Lichtfixierung findet sich im Dunkeln nur eine geringe Markierung der Stärke (rd.2 %). Dagegen ist im Dunkeln Malat zu etwa 50 % markiert, der Rest der Markierung verteilt sich auf Glutamat (15 %), Aspartat (12 %) etc.. Es zeigt sich allerdings, daß bei Tulpenepidermen auch bei Belichtung der Malatanteil mit 45 % relativ hoch bleibt. Trotzdem findet sich im Licht eine signifikante Markierung von Saccharose (20 %) und Stärke (10 %).

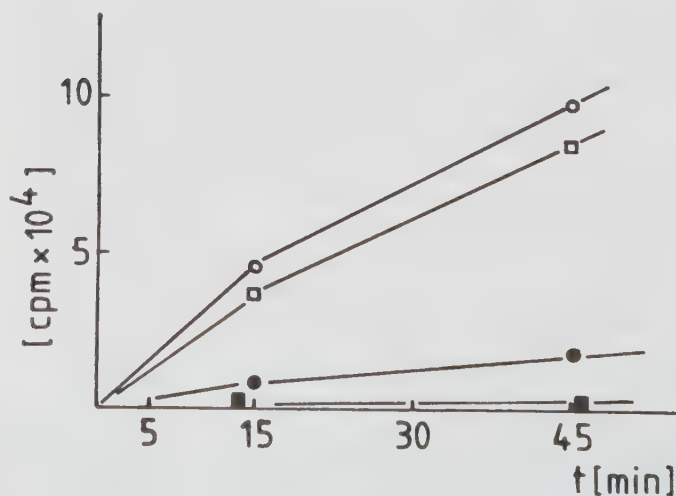


Abb.8:

Gesamtfixierungsraten der Epidermen von Tulipa bezogen auf 1 cm^2 Epidermisfläche (Gesamtfixierungsrate, Dunkel — □ , Belichtung — ○; Stärkeanteil Dunkel — ■ , Belichtung — ●).

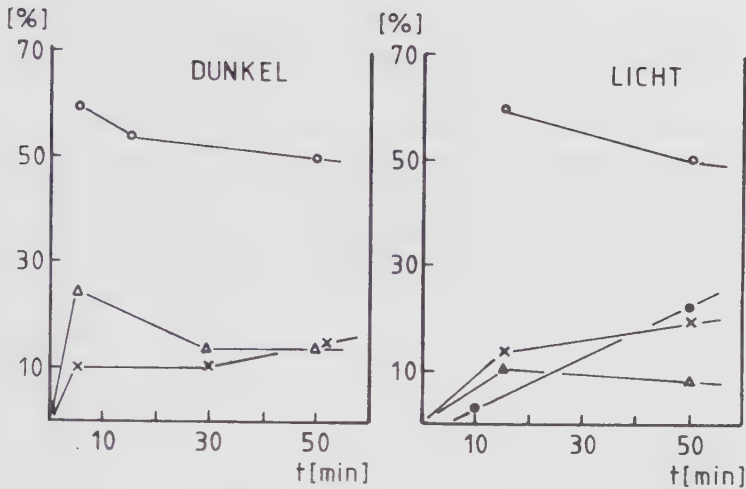


Abb.9:

$^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung von Tulipa-Epidermen im Licht und im Dunkeln: Prozentuale Verteilung der Metaboliten (o — Malat; Δ — Aspartat; x — Glutamat; ● — Saccharose)

Eine ebenfalls ähnliche Verteilung der radioaktiv markierten Metaboliten zeigen $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen mit isolierten und mittels Ultraschall gereinigten Epidermen von Nicotiana rustica im Licht. Wie Tabelle 2 zeigt, finden sich nach 45 min Fixierdauer etwa 20 % der Aktivität in Stärke, Saccharose ist zu 20 % und Malat zu 45 % markiert. Die Dunkelfixierungen zeigen dagegen keinen Einbau von $^{14}\text{CO}_2$ in Stärke oder Saccharose.

Es zeigt sich also, daß bei allen untersuchten Pflanzen, Zucker und Stärke, nicht aber phosphorylierte Kohlenhydrate, im Licht markiert werden und somit über den Stoffwechselweg der Gluconeogenese verfügen. Gemein scheint auch allen untersuchten Pflanzen eine Hemmung der Gluconeogenese während der Dunkelperiode.

Tab.2: $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen mit gereinigten Epidermen von Nicotiana rustica im Dunkeln und bei Belichtung: Verteilung der radioaktiv markierten Metaboliten in % nach 45 min Fixierdauer. Inkubationsmedium 30 mM Kaliumcitratpuffer/50 mM KCl.

	Licht	Dunkel
Malat	45	50
Aspartat	15	18
Citrat	4	9
Glutamat	5	7
Serin/Glycin	4	5
Saccharose	20	2
Stärkeanteil am Gesamtlöslichen	20	1

4.3. Malatpool und Gluconeogenese

Die $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen zeigen auch, daß der Malatanteil beim Öffnen auf Kaliumchlorid im Licht selbst bei gleichen Inkubationsbedingungen je nach verwendeter Pflanzenart unterschiedlich hoch ist. Dies könnte auch auf eine unterschiedliche Effektivität des Gluconeogenesebiosyntheseweges zurückzuführen sein. Jedenfalls läßt der unterschiedliche Malatpool evtl. auf eine unterschiedliche Beteiligung von Malat als Anion für importiertes Kalium schließen. Es ist bekannt, daß der Malatanteil an der Ladungskompensation bei verschiedenen Pflanzen variabel sein kann und wahrscheinlich von der Chloridverfügbarkeit abhängt. Es stellt sich die Frage

inwieweit bei Commelina communis Malat zur Ladungskompensation für importierte Kaliumionen beiträgt bzw. inwieweit Chlorid als Anion durch Malat zu ersetzen ist.

Obgleich bei Commelina communis ein gewisser Malatpool beim Öffnen vorhanden ist, wie die Fixierungen zeigen, scheint die Ladungskompensation durch Malat hier schwieriger zu sein, als die Ladungskompensation durch Chlorid. Das zeigt sich etwa daran, daß isolierte Commelinaepidermen bei Belichtung auf 150 mM KCl innerhalb von 90 min auf etwa 20 μm öffnen (s. Abb. 10).

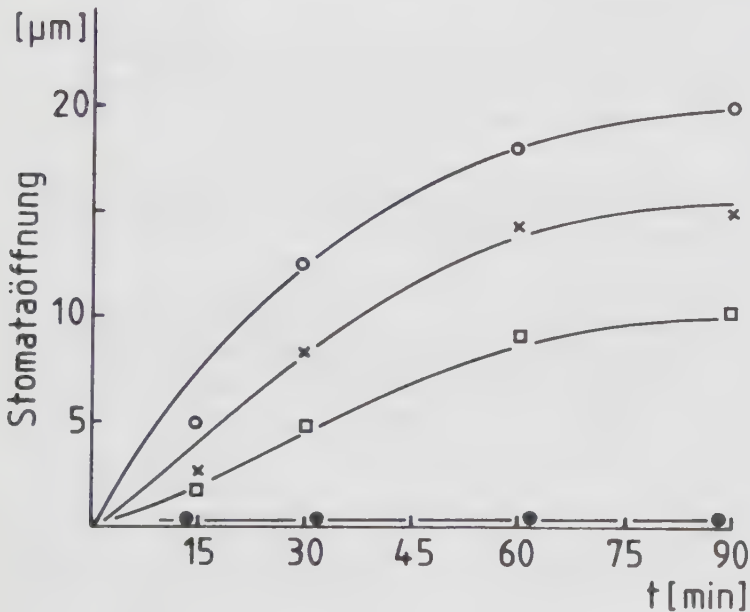


Abb. 10:

Stomataöffnungsweiten von Commelina communis bei Inkubation der isolierten Epidermen auf KCl 150 mM (—○), KCl 80 mM (—X), K₂SO₄ 100 mM (—□) und H₂O (—●).

Wird dagegen Kaliumsulfat 100 mM oder Kaliumiminodiacetat als Öffnungsmedium verwendet, so bleibt die Stomataöffnung auch nach 90 min mit ca. 10 μm relativ gering. Sowohl das Sulfatanion, als auch das Iminodiacetation sind nicht in der Lage, die Plasmalemmamembran zu permeieren. Importierte Kaliumionen können somit nur durch internes Malat kompensiert werden. Offensichtlich arbeitet diese Art der Ladungskompensation weniger effektiv, als die mit Chloridionen. Vielleicht ist ein besonders effektiver Gluconeogenese-mechanismus dafür verantwortlich, daß nicht genügend Malat akkumuliert werden kann.

Trotzdem sollte sich im Falle des Öffnens auf Kaliumsulfat ein größerer Malatpool einstellen, was durch die folgenden Versuche untersucht wurde.

5. Einfluß des Inkubationsmediums auf Fixierungsmuster und Fixierungsrate der Schließzellen

Durch $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen sollten Unterschiede in der Metabolitenverteilung, speziell im Malatgehalt, in Abhängigkeit der extern angebotenen Anionen nachgewiesen werden. Als Außenmedien wurden verwendet: KCl 150 mM, K_2SO_4 100 mM sowie Wasser. Die Auswertung der Versuche ist in Abb. 11 und Tabelle 3 wiedergegeben.

Abb.11:

$^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen mit isolierten Epidermen von Commelina communis: Prozentuale Verteilung von markiertem Malat (— o) und Saccharose (— ●) bei Inkubation auf KCl, K_2SO_4 und H_2O .

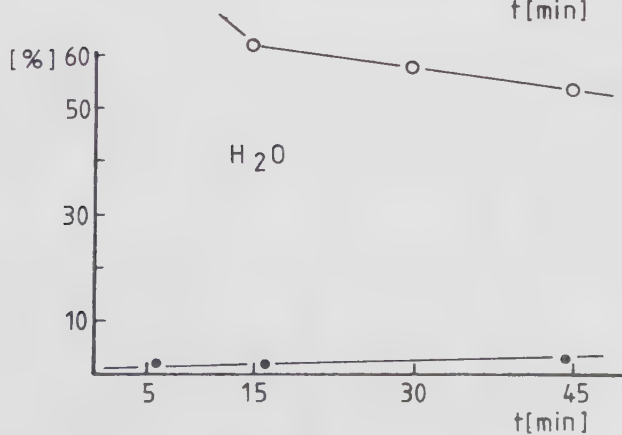
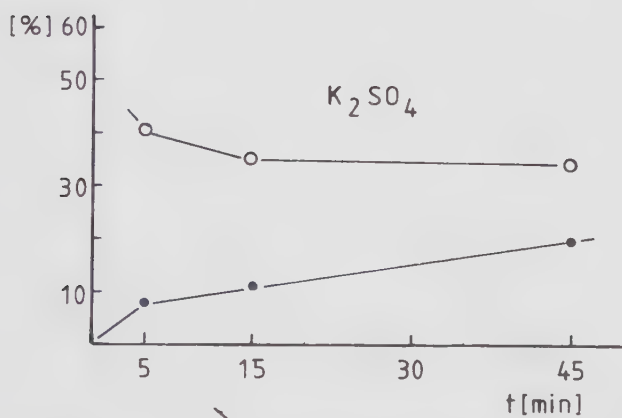
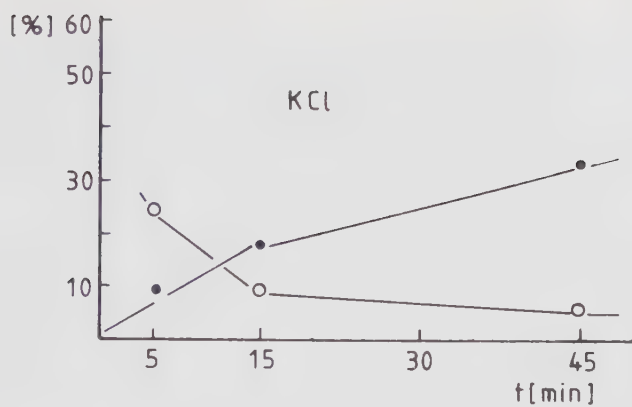


Abb. 11

Tab.3: $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen mit isolierten Epidermen von Commelina communis: Verteilung der markierten Metaboliten in Prozent bei Inkubation auf KCl 150 mM, K_2SO_4 100 mM und H_2O .

Zeit	KCl 150 mM				K_2SO_4 100 mM				H_2O	
	5	15	45		5	15	45		5	15
Malat	25	10	6		43	38	35		87	74
Aspartat	9	5	3		7	5	5		-	-
Succinat	7	6	5		7	5	4		4	6
Glycin/Serin	9	10	12		8	10	12		2	4
Citrat	4	2	2		3	2	2		3	3
Glutamat	14	12	8		13	10	6		-	1
Saccharose	10	18	38		8	15	22		2	4
Maltose	4	6	7		2	4	5		-	-
Fruktose	4	7	8		4	5	7		-	3
										5

Auf KCl-Lösungen inkubierte Epidermen enthielten nach 45 min einen relativ niederen Malatanteil von 15 % und einen hohen Anteil an markierter Saccharose von 35 %. Die Markierung in der Stärke beträgt etwa 20 % der Gesamtaktivität (Abb. 12).

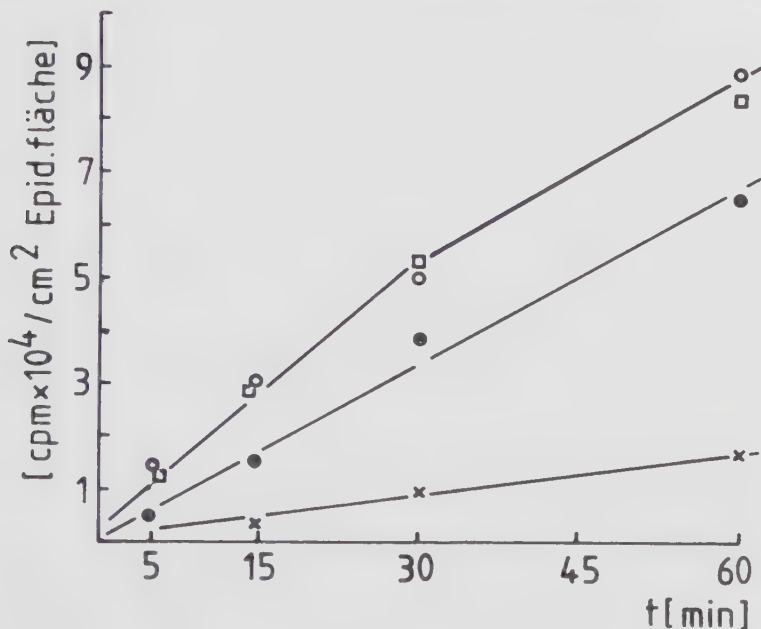


Abb.12:

$^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen mit isolierten Epidermen von Commelina communis: Gesamtfixierungsraten bei Inkubation der Epidermen auf KCl (—o—), K_2SO_4 (—□—) und Wasser (—●—); Stärkeanteil der $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen auf KCl und K_2SO_4 (—x—).

Der Rest der Markierung findet sich in verschiedenen organischen Säuren und Aminosäuren.

Die Epidermen auf Kaliumsulfat zeigen dagegen nach 45 min eine wesentlich höhere Markierung in Malat, etwa 35 %, während der Saccharoseanteil etwas niedriger, nämlich bei rund 20 % liegt. Stärke ist ebenfalls zu 20 % markiert. In der Verteilung der übrigen Metaboliten ergeben sich ebenfalls nur geringe Unterschiede. Die Annahme, daß Malat im Falle des Kaliumsulfats als Anion für importierte Kaliumionen wirkt, scheint sich hierdurch zu erhärten. Es zeigt sich gleichzeitig eine gewisse Tendenz, das im Licht synthetisierte, bzw. in der Nacht akkumulierte Malat wieder über Gluconeogenese in Stärke zurückzuverwandeln. Es wäre vorstellbar, daß dadurch Malat als ladungsausgleichendes Anion nur in begrenztem Umfang zur Verfügung steht, das Öffnen auf Kaliumsulfat daher zumindest erschwert ist. Auf jeden Fall ist die Effektivität der Gluconeogenese so groß, daß sich trotz erhöhtem Malatpool keine signifikant niedrigeren Einbauraten in Stärke zeigen (Abb.12). Auch die Gesamtfixierungsraten auf KCl und auf K_2SO_4 sind in etwa gleich groß.

Einen Sonderfall stellen die $^{14}CO_2$ -Fixierungen isolierter Epidermen auf Wasser dar. Ähnlich den Fixierungsmustern in der Dunkelphase finden sich nämlich fast ausschließlich organische Säuren markiert, während der Anteil der Markierung in der Saccharose deutlich unter 3 % liegt. Auch eine radioaktive Markierung der Stärke konnte nur in sehr geringem Umfang festgestellt werden. Zudem lag auch die Gesamtfixierungsrate der Epidermen auf Wasser um etwa ein Viertel niedriger, als dies bei den Inkubationen auf KCl oder K_2SO_4 der Fall war (Abb.12).

6. Einfluß von Abscisinsäure auf die Schließzellen- fixierungsmuster

Im Zusammenhang mit der Abscisinsäurewirkung wurde von Raschke (1979) die Vermutung vertreten, daß ABA die Malatsynthese beeinträchtigt, bzw. zu einer Übersäuerung des Schließzellen-cytoplasmas durch eine Überproduktion von Malat bei gleichzeitiger Hemmung der Protonenexportmechanismen führe. Es lag daher nahe, auch den Einfluß von ABA auf die $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen isolierter Epidermen zu untersuchen.

Die $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen wurden auf folgenden Inkubationsmedien durchgeführt: KCl 150 mM + ABA 10^{-4} M, K_2SO_4 100 mM + ABA 10^{-4} M und ABA 10^{-4} M allein. Die Ergebnisse sind in Abb. 13 und 14 und in Tabelle 4 zusammengestellt. Abb. 13 zeigt, daß die Gesamtfixierungsraten der auf ABA inkubierten Epidermen um etwa 30 % niedriger ausfielen, als bei den ohne ABA inkubierten Epidermen. Auch im Falle der $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung auf H_2O lagen die Gesamtfixierungsraten um 30 % niedriger.

In der Metabolitenverteilung zeigte sich, wie aus Tab.4 zu ersehen ist, im Falle der $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung auf KCl 100 mM + ABA keine besondere Veränderung in Bezug zu den $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen ohne ABA. Es konnte insbesondere kein signifikant veränderter Malatgehalt festgestellt werden. Auch die $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen auf H_2O + ABA zeigten unverändert hohe Malatanteile.

Bei den $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen auf Kaliumsulfat + ABA machte sich jedoch ein deutlicher ABA-Effekt bemerkbar. Der Malatpool war bei diesen $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen deutlich niedriger, als bei den $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen ohne ABA, er betrug nach einer Stunde rund 15 % und erreichte damit den Wert der $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen

auf KCl 150 mM. Das erscheint insofern verständlich, da bei Nichtöffnen der Stomata in diesem Falle auch kein Malat zur Ladungskompensation für importierte Kaliumionen benötigt wird.

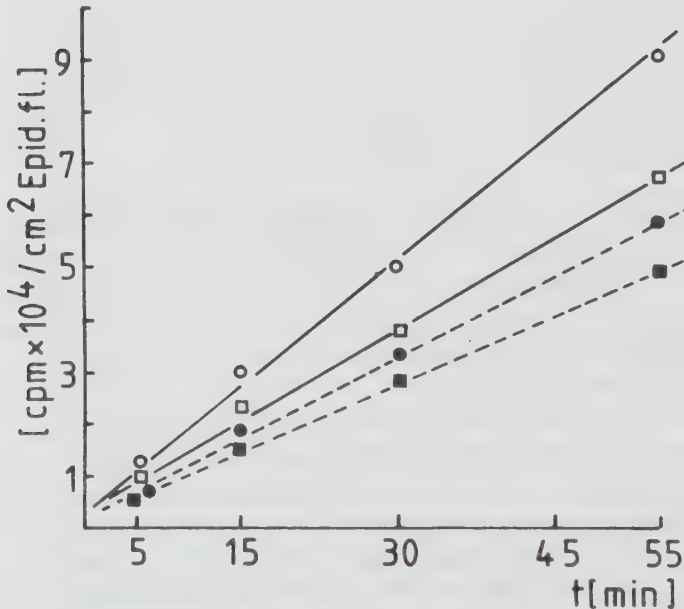


Abb.13:

¹⁴CO₂-Fixierungen mit isolierten Epidermen von Commelina communis: Gesamtfixierungsraten bei Inkubation auf KCl 150 mM/K₂SO₄ 100 mM (—○); H₂O (—□); KCl 150 mM/K₂SO₄ 100 mM + ABA 10⁻⁴ M (---●); H₂O + ABA 10⁻⁴ M (---■).

Was allerdings merkwürdig erscheint sind die niedrigen Gesamtfixierungsraten der ¹⁴CO₂-Fixierungen mit ABA. Sie gaben zu der Frage Anlaß, ob die ABA-Wirkung evtl. auf einer Hemmung der CO₂-Fixierung der Schließzellen, also dem Einbau von CO₂ in Malat

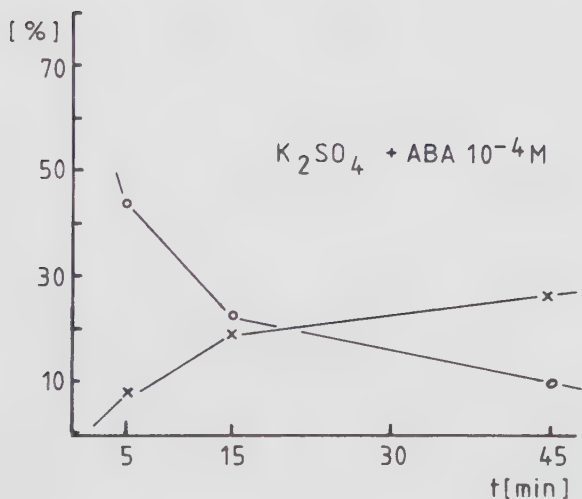
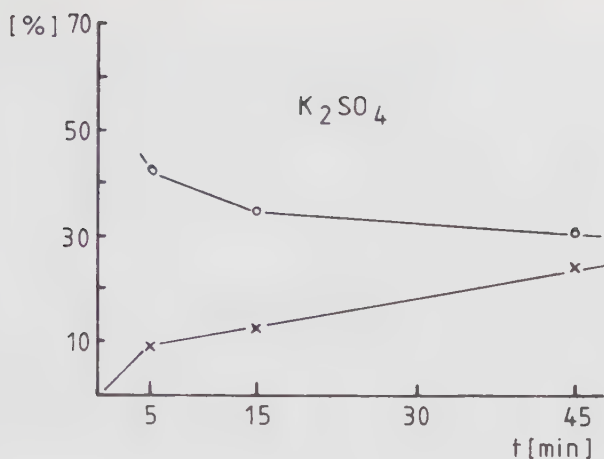


Abb.14:

$^{14}CO_2$ -Fixierungen mit isolierten Epidermen von Commelina communis: Prozentuale Verteilung der Radioaktivität in Malat (—o) und Saccharose (—X) bei Inkubation der Epidermen auf K_2SO_4 100 mM und K_2SO_4 100 mM + ABA 10^{-4} M.

Tab.4: $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen mit isolierten Epidermen von Commelina communis bei Inkubation auf $\text{KCl } 150 \text{ mM} + \text{ABA } 10^{-4} \text{ M}$, $\text{K}_2\text{SO}_4 \text{ } 100 \text{ mM} + \text{ABA } 10^{-4}$ und $\text{H}_2\text{O} + \text{ABA } 10^{-4} \text{ M}$: Verteilung der radioaktiv markierten Metaboliten in Prozent. (Klammerwerte entsprechen der Metabolitenverteilung ohne ABA).

Zeit	KCl + ABA			$\text{K}_2\text{SO}_4 + \text{ABA}$			$\text{H}_2\text{O} + \text{ABA}$		
	5	15	45	5	15	45	5	15	45
Malat	16(25)	5(10)	5(6)	45/43	25(38)	10(35)	90(87)	77(74)	62(60)
Aspartat	8(9)	6(5)	5(3)	10(7)	8(5)	8(5)	2(-)	2(-)	4(2)
Succinat	10(7)	8(6)	6(5)	7(7)	4(5)	3(4)	2(4)	5(6)	9(8)
Glycin/Serin	5(9)	8(10)	11(12)	9(8)	12(10)	15(12)	1(2)	4(4)	4(5)
Citrat	5(4)	2(2)	1(2)	2(3)	2(2)	1(2)	5(3)	6(3)	4(2)
Glutamat	12(14)	11(12)	7(8)	10(13)	8(10)	5(6)	-(-)	2(1)	5(5)
Saccharose	10(10)	25(18)	40(38)	8(8)	20(15)	33(22)	-(-)	2(4)	5(+)
Maltose	3(4)	4(6)	4(7)	-(-)	4(4)	8(5)	-(-)	-(-)	-(-)
Fructose	5(4)	7(7)	10(8)	2(4)	4(5)	8(7)	-(-)	-(-)	3(5)

beruht, oder ob evtl. markierte Produkte an das Außenmedium abgegeben werden. Es wurden daher auch die bisher unberücksichtigt gebliebenen Inkubationsmedien auf ihren Gehalt an radioaktiv markierten Metaboliten untersucht, die elektrophoretisch getrennt und durch Vergleichspherogramme identifiziert wurden.

7. Efflux markierter Verbindungen aus den Schließzellen in Abhängigkeit von der Ionenzusammensetzung des Außenmediums

7.1. Efflux in Abhängigkeit von der Kaliumchlorid- und Kaliumsulfatkonzentration

Folgende Medien wurden in Bezug auf Efflux getestet: KCl 150 mM; K_2SO_4 100 mM und H_2O . Die Auswertung der Markierungskinetiken ist in Abb. 15 und 16 dargestellt.

Es zeigte sich im Falle der $^{14}CO_2$ -Fixierungen auf Wasser, daß sich etwa ein Drittel der radioaktiv markierten Produkte im Inkubationsmedium befand (Abb.15). Die relativ niederen Gesamtfixierungsraten der Epidermis bei $^{14}CO_2$ -Fixierungen auf Wasser scheinen daher ihre Ursache in einem hohen Efflux von Metaboliten aus den Schließzellen zu haben. Die Identifizierung der Metaboliten im Außenmedium (Abb.15, rechts) zeigte einen besonders hohen Anteil an Malat von etwa 60 % nach 45 min, der sogar noch den der Schließzellen von rund 50 % übertraf. Der Anteil an anderen organischen Säuren und Aminosäuren war mit fast 20 % im Außenmedium etwas niedriger, als der Anteil in den Stomata (25 % nach 45 min).

Die Fixierungen auf KCl zeigen einen im Verhältnis zu den $^{14}CO_2$ -Fixierungen auf Wasser geringeren Efflux. Der Anteil der Radioaktivität im Außenmedium erreicht hier nur rund 15 % der gesamten fixierten Radioaktivität (Abb.16). Aber auch hier findet sich wieder ein relativ hoher Malatanteil im Außenmedium und ist mit ca. 30 % etwa doppelt so hoch, als in den Schließzellen (Abb.16).

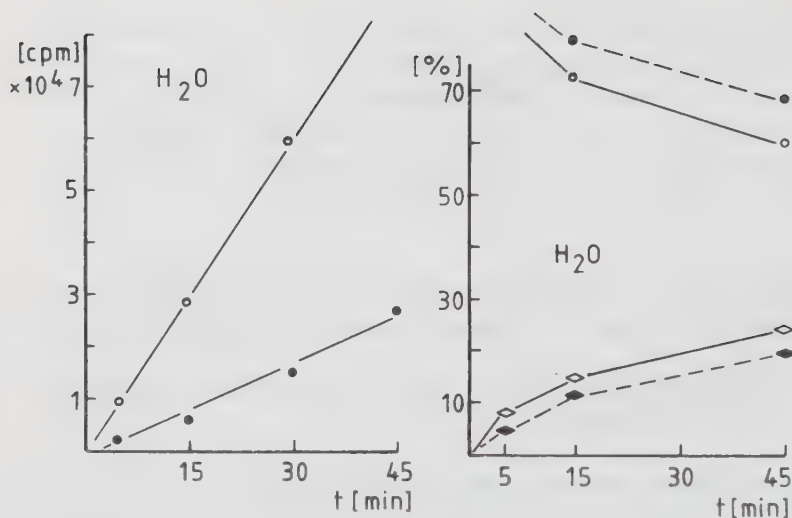


Abb.15:

¹⁴CO₂-Fixierungen mit isolierten Epidermen von Commelina communis: Gesamtfixierungsrate einschließlich der Aktivität im Medium bei Inkubation auf Wasser (—o) und Anteil der Markierung im Inkubationsmedium (—●) in cpm × 10⁴/cm² Epidermisfläche (Abb.links). Rechte Abbildung: Prozentuale Verteilung von Malat (—●) und anderen org. Säuren einschließlich Aminosäuren (—◇) in den Schließzellen (durchgezogene Linie) und im Inkubationsmedium (gestrichelte Linie).

Abb.16:

¹⁴CO₂-Fixierungen mit isolierten Epidermen von Commelina communis links: Gesamtfixierungsraten inclusive Anteil der Aktivität im Medium (—o) und Anteil der Aktivität im Medium (—●) bei Inkubation der Epidermen auf KCl 150 mM und KCl 150 mM + ABA 10⁻⁴ M. rechts: Verteilung der Radioaktivität in Malat (—●) und in ungeladenen Verbindungen (—▲) in Prozent (durchgezogene Linie intern; gestrichelte Linie extern).

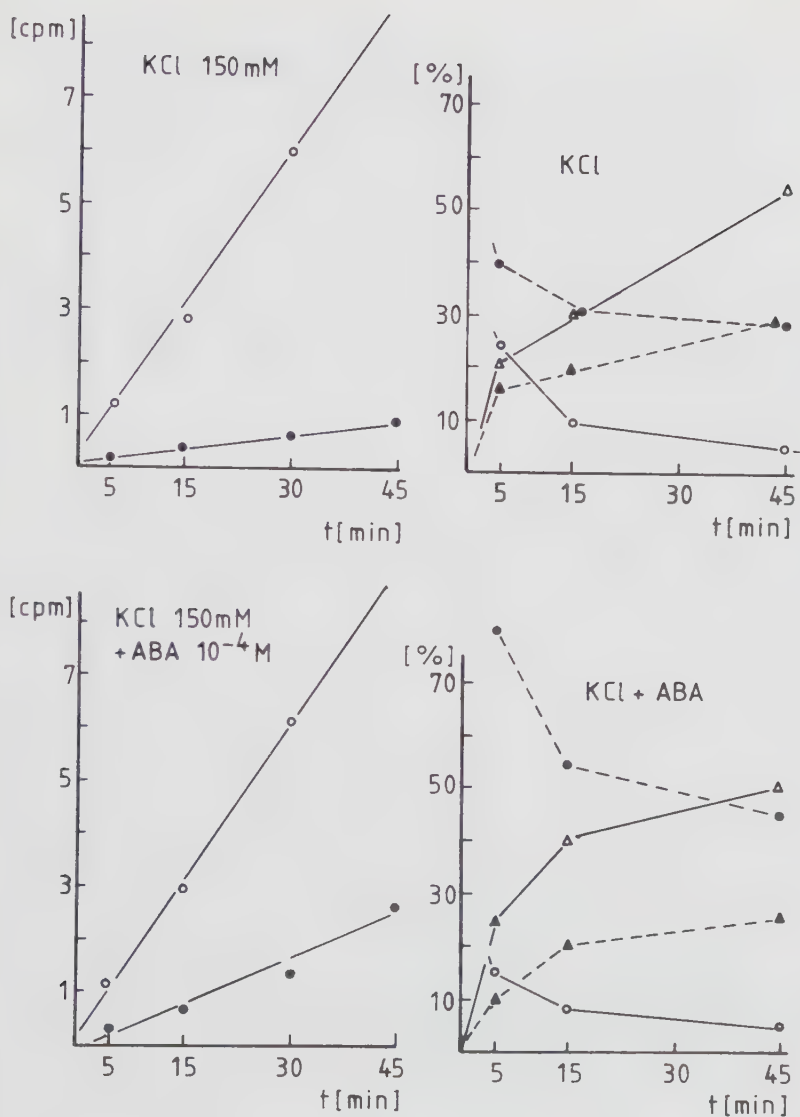


Abb. 16

Der Rest der Aktivität im Außenmedium verteilte sich auf ungeladene Verbindungen (35 %) und andere organische Säuren und Aminosäuren (30 %). Es fand sich also das gesamte Spektrum der in den Schließzellen markierten Produkte auch im Inkubationsmedium.

Bei den $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen auf Kaliumsulfat fanden sich ähnliche Verhältnisse, wie bei den $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen auf Kaliumchlorid. Der Efflux war mit 15 % des Gesamtlöslichen ebenfalls geringer, als bei den $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen auf Wasser, wobei der Anteil von Malat im Außenmedium rund 45 % betrug.

7.2. Einfluß von Abscisinsäure auf den Efflux

Auch der Einfluß der Abscisinsäure auf den Efflux markierter Metaboliten wurde untersucht. Wie Abb. 16 und Tab. 5 zeigen, bewirkt ABA dabei eine signifikante Erhöhung des Efflux bei der $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung auf $\text{KCl } 150 \text{ mM} + \text{ABA } 10^{-4} \text{ M}$. Dies zeigt sich daran, daß der Anteil der Radioaktivität im Inkubationsmedium doppelt so hoch ist, als bei den Kontroll- $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen ohne ABA. Die Auswertung der Verteilung der identifizierten Metaboliten ergab einen besonders hohen Malatanteil von 40 % im Efflux. Ähnliche Verhältnisse zeigten die $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen mit ABA auf $\text{K}_2\text{SO}_4 \text{ } 100 \text{ mM}$. Auch hier ein doppelt so hoher Efflux wie bei den $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen ohne ABA, mit dem Unterschied, daß der Malatanteil im Außenmedium mit etwa 60 % noch höher als bei $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen auf $\text{KCl } 150 \text{ mM} + \text{ABA } 10^{-4} \text{ M}$ lag. Dies zeigt, daß besonders der Efflux von Malat gesteigert wird; der durch ABA induzierte Efflux beruht offensichtlich zum Teil auf einer spezifischen Erhöhung der Malatleitfähigkeit der Schließzellenmembran.

Tab.5: $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen mit isolierten Epidermen von Commelina communis: Prozentuale Verteilung der radioaktiv markierten Metaboliten in den Schließzellen (intern) und im Inkubationsmedium (extern) bei Inkubation der Epidermen auf H_2O , KCl 150 mM, KCl 150 mM + $\text{ABA } 10^{-4}$ M, K_2SO_4 100 mM und K_2SO_4 100 mM + $\text{ABA } 10^{-4}$ M.

Medium/Zeit	Malat		org.Säuren und AS		ungeladene Verbindungen	
	intern	extern	intern	extern	intern	extern
H_2O 5 min	87	90	9	5	-	-
15 min	74	80	15	10	-	-
45 min	60	68	24	20	10	8
KCl 5 min	25	35	45	38	20	15
15 min	10	30	36	30	30	20
45 min	6	28	30	24	55	29
$\text{KCl} +$ 5 min	16	80	47	6	25	10
ABA 15 min	8	55	40	20	40	20
45 min	6	45	35	25	50	25
K_2SO_4 5 min	43	50	32	26	15	10
15 min	38	45	20	15	30	25
45 min	35	40	15	10	45	35
$\text{K}_2\text{SO}_4 +$ 5 min	45	85	35	4	20	10
ABA 15 min	25	60	32	10	35	20
45 min	10	45	27	15	50	25

7.3. Einfluß von ABA auf den Efflux isolierter Epidermen von $^{14}\text{CO}_2$ -markierten Blättern

Zur Überprüfung der vorigen Ergebnisse wurden noch Versuche mit am Blatt vorfixierten Epidermen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden junge Commelinapflanzen im Licht radioaktivem $^{14}\text{CO}_2$ für 4 h ausgesetzt. Danach wurden die Epidermen (Schließzellen offen) isoliert, kurz unter dem Mikroskop gereinigt und auf 150 mM KCl im Licht inkubiert. Alle 5 min wurden dem Inkubationsmedium Proben entnommen und die Radioaktivität bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 17 dargestellt. Besonders innerhalb der ersten 10 min wurde eine beträchtliche Menge an Radioaktivität ins Medium abgegeben, danach verlangsamte sich die Abgabe. Nach 60 min befand sich die Hälfte der anfänglichen Aktivität der Epidermis im Inkubationsmedium, wobei etwa 30 % der Aktivität im Medium als Malat nachzuweisen war. Daneben fand sich in unterschiedlichen Verhältnissen auch fast das gesamte Spektrum der im Schließzellenprotoplasten markierten Produkte.

Wird dasselbe Experiment zusätzlich mit ABA durchgeführt, so zeigt sich anfänglich der gleiche sprunghafte Anstieg an Radioaktivität im Medium, wie bei den Versuchen ohne ABA. Der nach 10 min folgende Export an Aktivität ist aber, wie aus Abb. 17 zu ersehen ist, wesentlich höher und deutet auf einen erhöhten Schließzellenefflux, der durch ABA verursacht wird.

Der Aktivitätssprung am Anfang der Experimente dürfte seine Ursachen darin haben, daß sich ein großer Anteil markierter Metaboliten, vom Mesophyll angeliefert, auch im Apoplasten befindet. Raschke und Dittrich (1977) konnten ja zeigen, daß zwischen Mesophyllzellen und Schließzellen über den Apoplasten Stoffaustausch stattfindet. Die im Apoplasten

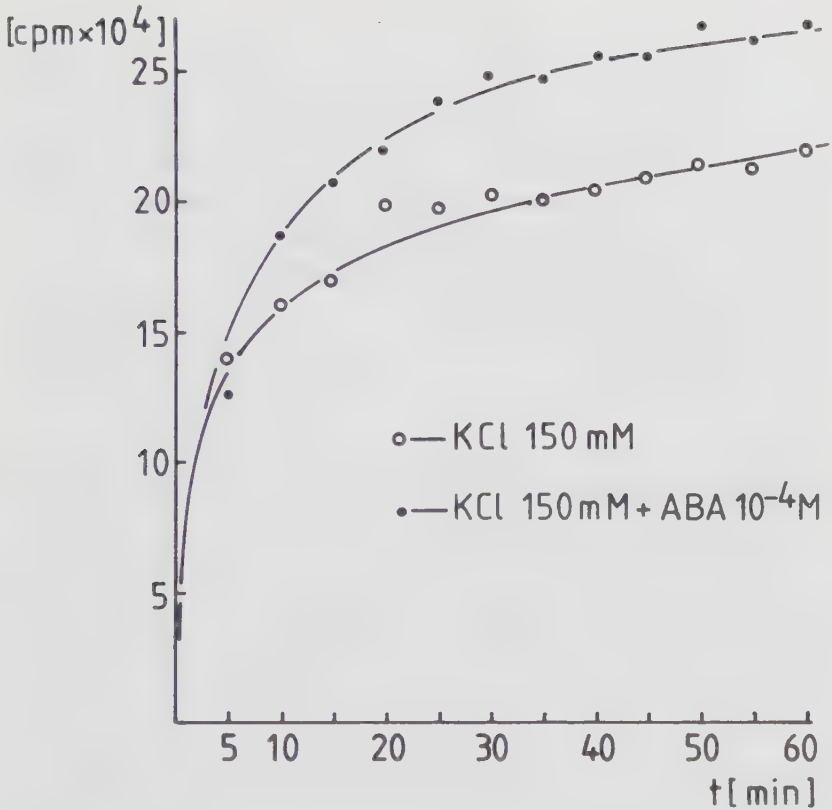


Abb.17:

$^{14}\text{CO}_2$ -Markierung ganzer, intakter Blätter von *Commelina communis*: Efflux von Radioaktivität aus den anschließend isolierten Epidermen ins Medium bei Inkubation auf KCl 150 mM und KCl 150 mM + ABA 10^{-4} M in cpm/cm² Epidermisfläche.

befindlichen markierten Verbindungen können dann, wie auch aus dem ersten Kapitel hervorgeht, schnell ans Medium abgegeben werden und verursachen den beobachteten Aktivitätssprung. Die darauf folgende Aktivitätsabgabe (von ca. 10-60 min) könnte auf den Schließzellenefflux zurückzuführen sein.

8. Zusammenfassung von Kapitel III

Ein auffallendes Ergebnis der vorhergehenden Versuche stellt die Tatsache dar, daß während der Dunkelphase die Gluconeogenese der Schließzellen gehemmt scheint. Zu dieser Zeit findet aber in intakten Blattepidermen die Schließzellenstärkesynthese statt (Outlaw und Manchester, 1979; Pallas, 1964). Die Experimente mit ^{14}C -markierten Zuckern zeigen, daß dies auch während der Dunkelphase möglich ist. Auch PEP wird im Dunkel zu Stärke umgewandelt, wenn auch in geringerem Umfange. Das bedeutet, daß innerhalb des Gluconeogenesemechanismus der Schritt von Oxalacetat bzw. Malat zum Phosphoenolpyruvat blockiert sein muß. Die Carboxylierung von PEP bleibt dabei bei Commelina communis unbeeinflusst, wie die Gesamtfixierungsraten im Licht und in der Dunkelheit zeigen. Das schließt nicht aus, daß bei anderen Pflanzen, etwa infolge des niederen cytoplasmatischen pH durch Malatanhäufung, eine Hemmung der CO_2 -Fixierung der Schließzellen in der Dunkelphase, wie sie schon beobachtet wurde (Raschke, 1979), stattfindet. Hier wäre an eine Hemmung der PEP-Carboxylase zu denken.

Während der Dunkelheit wird jedenfalls bei Commelina neben Malat auch Citrat angehäuft und nicht mehr weitermetabolisiert. Die Ursache kann vielleicht an der Beteiligung eines lichtempfindlichen Schrittes liegen, etwa die Mitwirkung eines lichtstimulierten Enzyms wie Pyruvat-Phosphat-Dikinase. Der ökologische Sinn dieses Phänomens könnte vielleicht darin zu suchen sein, daß zu Beginn der Lichtphase, die den Öffnungsstimulus darstellt, mit Malat eine genügende Anzahl von Ladungsäquivalenten für zu importierendes Kalium, bzw. eine Protonenquelle für die Protonenpumpe zur Verfügung steht. Dies hätte besonders für solche Pflanzen Sinn, denen nur wenig Chlorid zur Ladungskompensation zur Verfügung steht.

Während der Lichtphase wird dann offensichtlich der im Dunkeln angehäuften Malatpool durch teilweisen Einbau in Stärke oder Efflux in den Apoplasten wieder abgebaut. Der Malatpool paßt sich während der Lichtphase dem Malatbedürfnis an. Dieses scheint, wie die Versuche zeigen, von der Anwesenheit von Chloridionen abzuhängen. Im Falle der $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen auf KCl stellt sich ein relativ geringer Malatpool ein, da offensichtlich importiertes Kalium, durch gleichzeitig importierte Chloridionen, kompensiert werden kann. Überschüssiges Malat wird dann über Gluconeogenese wieder in Stärke zurückverwandelt.

Im Falle der $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen auf K_2SO_4 ist bei *Commelina* der Anteil des markierten Malat deutlich erhöht. Der Malatpool muß intern höher gehalten werden, da kein Chlorid zur Ladungskompensation zur Verfügung steht. Trotzdem scheint dieser Malatpool für ein optimales Öffnen nicht auszureichen, da die Stomata auf K_2SO_4 nicht die Öffnungsweite, wie auf KCl erreichen. Vielleicht ist ein aktiver Gluconeogenesemechanismus dafür verantwortlich, daß kein großer Malatpool erreicht werden kann. Der ähnlich große Anteil der Stärke an den Gesamtfixierungsraten auf K_2SO_4 und auf KCl, sowie die vergleichbaren Saccharosemarkierungen mögen ein Hinweis darauf sein.

In vivo bedeutet das, daß solche Pflanzen für normales Wachstum auf eine gute Chloridversorgung angewiesen sind. Im Gegensatz dazu sind Pflanzen bekannt, die von der Chloridversorgung weitgehend unabhängig sind. Humble und Raschke (1971) beschreiben ein solches System etwa für *Vicia faba*.

Wie aber läßt sich der hohe Malatpool der auf Wasser inkubierten Epidermen erklären. Die niedrigen Gesamtfixierungsraten und die Effluxexperimente weisen auf eine hohe Efflux-

rate hin. Das heißt, die Schließzellen verlieren, vermutlich passiv, viele Metaboliten, wobei der Anteil an Malat relativ hoch ist. Es kann vermutet werden, daß die Malatverluste so hoch sind, daß die für eine Weitermetabolisierung von Malat notwendige Konzentration nicht erreicht wird.

Die Effluxversuche zeigen weiterhin, daß bei Anwesenheit von 150 mM Kalium im Außenmedium der Efflux der Metaboliten wesentlich verringert ist. Dies scheint nur für Kaliumionen verständlich, da die nunmehr höhere Außenkonzentration eine Verringerung des Kaliumkonzentrationsgradienten zwischen Schließzelleninnerem und Inkubationsmedium zur Folge hat, der rein passive Efflux von Metaboliten, einschließlich Malat, ins Medium hingegen nicht beeinflußt werden sollte. Dennoch muß davon ausgegangen werden, daß die Schließzellen besonders beim Öffnen ständig Malat und auch andere Metaboliten an den Apoplasten verlieren. Dies wird natürlich auch durch die hohe Permeabilität der Schließzellenmembran (Saftner und Raschke, 1981) begünstigt. Vielleicht ist letztlich auch das Verschwinden der Schließzellenstärke beim Öffnen der Stomata so zu begründen, daß das durch Efflux verlorengegangene Malat, das zumindest in gewissem Umfang als Protonenquelle und teilweise zum Ladungsausgleich benötigt wird, ständig aus Stärke neu gebildet werden muß. Die von Bowling (1976) aufgestellt "malate switch hypothesis", wonach der Gesamtmalatgehalt der Epidermis bei offenen oder geschlossenen Stomata gleichbleibt, könnte in dieser Erscheinung eine Unterstützung finden.

Offensichtlich läßt sich auch die Abscisinsäurewirkung auf einen erhöhten Efflux von Metaboliten, spezifisch aber Malat, zurückführen. Der von Raschke (1979) vermutete ABA-Mechanismus über eine erhöhte interne Malatproduktion ließ

sich jedenfalls nicht bestätigen. Es kann vermutet werden, daß ABA indirekt über eine Änderung der Plasmalemmapermeabilitätseigenschaften wirkt. Dies hat u.a. einen erhöhten Efflux von Malat zur Folge. Gleichzeitig läßt sich vermuten, daß auch der Efflux anderer osmoaktiver Ionen, wie Chlorid und Kalium, erhöht ist. Damit ist aber eine Akkumulation von Kalium in den Schließzellen, selbst bei funktionierender Protonenpumpe, ausgeschlossen. Die Stomata schließen daher bzw. öffnen erst gar nicht.

IV. Enzymaktivitäten in der Epidermis von *Commelina communis*

1. Epidermisenzyme

Zur Ergänzung der bei den $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungsversuchen in Bezug auf die Gluconeogenese gefundenen Ergebnisse, sollten auch die für diesen Biosyntheseweg notwendigen Enzyme in der Epidermis nachgewiesen werden. Es liegen bereits zahlreiche Untersuchungen zur enzymatischen Ausstattung der Epidermis vor (u.a. Willmer et al., 1973; Willmer und Dittrich, 1974; Thorpe et al., 1978; Outlaw et al., 1979a; Outlaw et al., 1979b; Schnabl, 1981), bei denen hauptsächlich die carboxylierenden Enzyme Ribulosebisdiphosphatcarboxylase (RuDP-C) und Phosphoenolcarboxylase (PEP-C), sowie Malatdehydrogenase (MDH) und Malic enzyme untersucht und zum Teil charakterisiert wurden.

Allen Untersuchungen war gemein, daß keine oder nur geringe RuDP-C-Aktivitäten gefunden werden konnten. Das Fehlen der phosphorylierten Zucker bei den $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen der isolierten Epidermen fand somit durch das Fehlen des Leitenzyms des Calvinzyklus auch auf enzymatischer Ebene Bestätigung.

Demgegenüber wurden die Schlüsselenzyme des Biosyntheseweges der Gluconeogenese, der ja für den Stärkeaufbau in den Schließzellen verantwortlich ist, wie Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEP-CK) und Pyruvat-Phosphatdikinase, die die Reaktion von Oxalacetat, bzw. Pyruvat zu Phosphoenolpyruvat katalysieren, wenig untersucht bzw. wurden nicht gefunden. Lediglich Schnabl (1981) konnte an Schließzellenprotoplasten von Vicia faba Aktivitäten von Pyruvat-Phosphatdikinase feststellen. Auch Das und Raghavendra (1974) fanden in normalen Epidermen von Commelina cyanea geringe Aktivitäten dieses Enzyms.

2. Vergleich der Enzymaktivitäten in intakten Epidermen und in Epidermen mit isolierten Schließzellen von Commelina communis

Außer Schnabl (1981) verwendeten alle anfangs erwähnten Autoren normale, isolierte Epidermen von verschiedenen Pflanzen. Dies scheint aber problematisch, da zur Messung der epidermalen Enzymaktivitäten infolge der geringen Zelldichte große Mengen an Epidermen erforderlich sind. Dies wiederum bedeutet, daß ohne großen Zeitaufwand eine Entfernung der Mesophyllkontaminationen, z.B. gerade bei den meist reichlich kontaminierten Epidermen von Vicia faba, sehr schwierig erscheint. Bei diesen Untersuchungen können aber Mesophyllzellen leicht Enzymaktivitäten, etwa RuDP-Carboxylase, vortäuschen, die tatsächlich für die Epidermis nicht typisch sind. Um die lange Prozedur der Protoplastenisolierung zu umgehen, wurden daher 90 min in Cellulysin inkubierte Epidermen von Commelina communis verwendet. Die so behandelten Epidermen enthalten nur noch isolierte Schließzellen, da Epidermis- und Nebenzellenprotoplasten schon vorher ausgetreten sind. Die Herstellung des Rohextrakts konnte dann wie bei intakten Epidermen durchgeführt werden und erforderte relativ wenig Zeit. Zur Kontrolle wurde gleichzeitig auch

ein Rohextrakt von isolierten, ungereinigten Epidermen hergestellt. Um einigermaßen ausreichende Rohextraktmengen zu erhalten wurde jeweils eine Epidermisfläche von ca. 100 cm^2 extrahiert, was das Aufarbeiten von 40-50 Blättern notwendig macht.

Die Rohextrakte wurden auf folgende Enzyme getestet: RuDP-C, PEP-C, MDH, malic enzyme und PEP-CK, wobei letzteres besonders im Hinblick auf die Gluconeogenese interessant schien.

Die Ergebnisse der Enzymaktivitätsmessungen sind in Tab.6 zusammengestellt. Es finden sich große Aktivitäten an NAD-aktivierter Malatdehydrogenase, sie betragen beim Rohextrakt aus ungereinigten Epidermen 2.2 nMol/cm^2 Epidermisfläche,

Tab.6: Enzymaktivitäten in isolierten und in enzymatisch vorbehandelten, teilweise lysierten Epidermen von Commelina communis.

Enzym	Enzymaktivität $\text{nMol/h} \times \text{cm}^2$ Epidermisfläche
MDH (NAD), Gesamtepidermis	2.2
MDH (NAD), isolierte SZ	0.5
PEP-C, Gesamtepidermis	0.16
PEP-C, isolierte SZ	0.05
malic enzyme, Gesamtepidermis	0.45
PEP-CK, Gesamtepidermis	Ø
PEP-CK, isolierte SZ	0.2

während die Aktivität der cellulysinbehandelten Epidermen nur etwa ein Viertel davon betrug. Für die Aktivität der Malatdehydrogenaseaktivität, wie auch der übrigen getesteten Enzyme spielt es keine Rolle, ob der Rohextrakt über eine G-25-Säule gegeben wurde oder nicht.

Die Aktivitäten an PEP-C waren weit geringer. Sie betrugen bei den ungereinigten Epidermen $0,16 \text{ nMol/cm}^2$ Epidermisfläche und ein Drittel bei den Epidermen mit den isolierten Schließzellen. Die Zugabe von $10 \mu\text{l}$ Manganchlorid $0,5 \text{ M}$ bewirkte in beiden Fällen eine leichte Hemmung der Enzymaktivität.

RuDP-Carboxylase ließ sich in sehr geringer Aktivität nur bei dem ungereinigten Epidermisrohextrakt nachweisen.

Malic enzyme wurde nur bei den ungereinigten Epidermen getestet und wies eine Enzymaktivität von $0,45 \text{ nMol/cm}^2$ Epidermisfläche auf. Bei der Messung der PEP-CK ergab sich zunächst im photometrischen Test weder bei den ungereinigten noch bei den cellulysininkubierten Epidermen eine Enzymaktivität. Auch die radioaktive $^{14}\text{CO}_2$ -Austauschreaktion erbrachte beim Rohextrakt der ungereinigten Epidermen keinen $^{14}\text{CO}_2$ -Einbau. Die cellulysininkubierten Epidermen zeigten dagegen $^{14}\text{CO}_2$ -Einbau. Es errechnete sich eine Aktivität von $0,2 \text{ nMol/h} \times \text{cm}^2$ Epidermisfläche. Wie aus Abb. 18 zu ersehen ist, ließ sich durch Zugabe von Malat und einer höheren ATP-Konzentration eine Steigerung der Enzymaktivität erreichen.

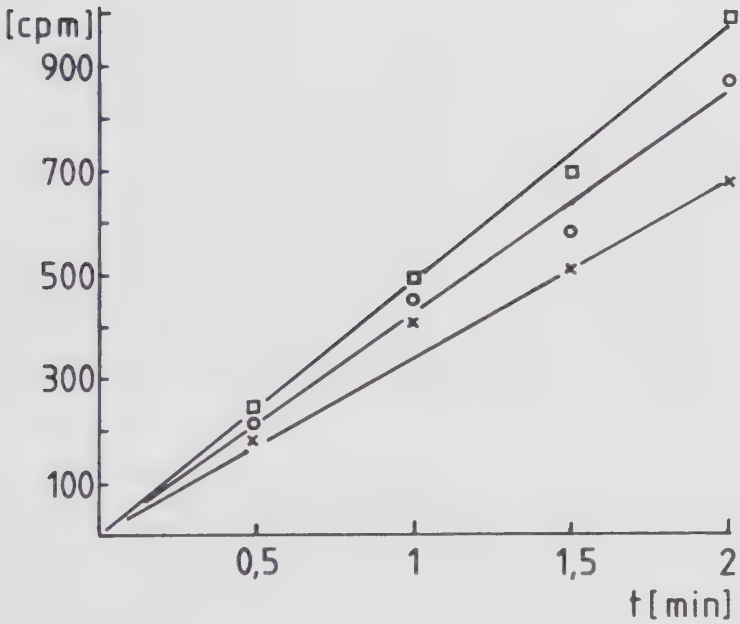


Abb.18:

$^{14}\text{CO}_2$ -PEP-CK-Austauschreaktion: Einfluß von Malat und ATP auf die PEP-CK-Enzymaktivität (50 μl RE + 10 mM ATP —x; 50 μl RE + 20 mM ATP —○; 50 μl RE + 20 mM ATP + 20 mM Malat —□); spezifische Aktivität 1.3×10^7 cpm/ μM CO_2 .

3. Zusammenfassung von Kapitel IV

Die Untersuchungen an Epidermen mit isolierten Schließzellen zeigen das Vorhandensein des für die Gluconeogenese als Schlüsselenzym fungierenden Enzyms PEP-CK. Malat führt bei diesem Enzym zu einer Steigerung seiner Aktivität, was in vivo bedeuten könnte, daß eine Anhäufung von Malat in den Schließzellen gleichzeitig durch Erhöhung der PEP-CK-Aktivität zu einem schnelleren Umsatz von Malat führen würde. Das würde bedeuten, daß ein gewisser Höchstwert an Malat in den Schließzellen nicht überschritten werden könnte. Vielleicht wäre hierin eine der Ursachen für die schlechte Öffnungsreaktion der Stomata von Commelina communis auf Kaliumsulfat zu sehen.

Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß das von Schnabl (1981) in Schließzellenprotoplasten entdeckte Enzym Pyruvat-Phosphat-Dikinase indirekt ebenfalls an der Umsetzung von Malat beteiligt ist, da es das von malic enzyme angelieferte Pyruvat zu PEP umwandelt. Da es sich hierbei um ein lichtstimuliertes Enzym handelt, wäre auch die Dunkelhemmung der Gluconeogenese erklärbar.

Warum bei den ungereinigten Epidermen keine PEP-CK-Aktivität gefunden werden konnte, liegt vielleicht daran, daß Neben- und Epidermiszellenbestandteile im Rohextrakt einen hemmenden Einfluß auf die PEP-CK-Aktivität ausüben.

Die insgesamt niedrigeren Enzymaktivitäten der cellulysin-gereinigten Epidermen sind wohl zum Teil auf in den Neben- und Epidermiszellen vorhandenen Enzymaktivitäten, als auch auf Beschädigung von Schließzellen zurückzuführen.

V. Reaktivität der Stomata beim Schließen

1. Phänomene und ABA-Wirkungshypothesen

Werden Blätter von Commelina communis einige Zeit belichtet und die Epidermen anschließend isoliert, so sind die Stomata geöffnet. Überträgt man diese Epidermen mit geöffneten Stomata auf destilliertes Wasser, so schließen die Stomata auch im Licht allmählich (30 min). Werden die Epidermen jedoch auf $ABA\ 10^{-4}\ M$ inkubiert, so sind die Stomata innerhalb weniger Minuten geschlossen. Im ersten Fall ist die Kaliumakkumulation unterbrochen und der passive Efflux bedingt das langsame Schließen der Stomata (s.a.Kap.I). Es besteht allerdings Unklarheit, ob energieverbrauchende Prozesse an dieser Reaktion beteiligt sind.

Auch im zweiten Fall, dem Schließen der Stomata auf ABA, bestehen trotz zahlreicher Untersuchungen noch Unklarheiten. Mehrere Wirkungsmechanismen werden diskutiert. Nach Raschke (1979) hemmt ABA entweder die Protonenpumpe und damit die Kaliumakkumulation oder ABA steigert die Malatsynthese der Schließzellen und der resultierende niedere intrazelluläre pH induziert den Efflux von Kalium und osmoaktiven Anionen (s.a.Kap.III.7.2.). Daneben wird in letzter Zeit ein Einfluß der Abscisinsäure auf die Schließzellenmembranpermeabilität diskutiert (MacRobbie, 1981b; Lea und Collins, 1979; Gepstein et al., 1983).

ABA wird bei Wasserstreß der Blätter in den Mesophyllzellen-chloroplasten synthetisiert. Eine schnelle Steuerung der Spaltöffnungsbewegung scheint über diesen Mechanismus nur bei extremem Wassermangel denkbar. Weiler et al. (1982) konnten aber nachweisen, daß auch die Schließzellenchloroplasten zur ABA-Synthese fähig sind und damit auch eine kurzfristige Steuerung der Stomatabewegung denkbar wäre.

Die Energieabhängigkeit der ABA-Wirkung ist ebenfalls nur ansatzweise untersucht. Die folgenden Untersuchungen sollten daher die Energieabhängigkeit des Schließens und die Effluxverhältnisse beim Schließen zu klären versuchen.

2. Temperaturabhängigkeit des Schließens

Durch eine Untersuchung der Temperaturabhängigkeit des Schließens kann man eine Energieabhängigkeit der daran beteiligten Prozesse beurteilen. Dazu wurden Blätter von Commelina communis für 2 h belichtet, die Epidermen mit geöffneten Stomata isoliert und diese dann auf H_2O und ABA 10^{-4} M bei $30^{\circ}C$ und bei $3.5^{\circ}C$ inkubiert.

Die auf H_2O inkubierten Epidermen bei $30^{\circ}C$ waren nach ca. 30-40 min komplett geschlossen. Wurde derselbe Versuch bei $3.5^{\circ}C$ durchgeführt, so waren nach derselben Zeit die Stomata erst zur Hälfte geschlossen, sie hatten noch eine Öffnungsweite von ca. $10\ \mu m$ bei einer Ausgangsweite von etwa $20\ \mu m$ (Abb.19).

Besonders signifikant zeigte sich die Temperaturabhängigkeit des Schließens auf ABA. Wie Abb. 19 zeigt, führt ABA 10^{-4} M bei $30^{\circ}C$ innerhalb von 5-10 min zum kompletten Stomata-schluß. Bei $3.5^{\circ}C$ aber unterscheidet sich die Schließgeschwindigkeit auf ABA 10^{-4} M praktisch nicht mehr von der auf Wasser. Aus den Kinetiken lassen sich die Q_{10} -Werte des Schließens auf H_2O und auf ABA errechnen. Sie ergeben für das Schließen auf H_2O einen Q_{10} -Wert von ca. 1.6 und für das ABA-katalysierte Schließen einen Q_{10} -Wert von ca. 2.4.

Gleichzeitig wurde auch die Temperaturabhängigkeit des Öffnens auf KCl 150 mM getestet. Es zeigte sich, daß das Öffnen auf KCl ähnlich temperaturabhängig ist, wie das Schließen auf ABA. Während bei $30^{\circ}C$ im Licht die isolierten

Epidermen mit geschlossenen Stomata nach 2 h Inkubation auf KCl 150 mM Öffnungsweiten von $20\text{ }\mu\text{m}$ zeigten, sind bei 3.5°C nur geringe Öffnungen von etwa $3\text{--}5\text{ }\mu\text{m}$ festzustellen. Die Berechnung des Q_{10} -Wertes für das Öffnen der Stomata auf KCl 150 mM ergibt einen Wert von ca. 2.2.

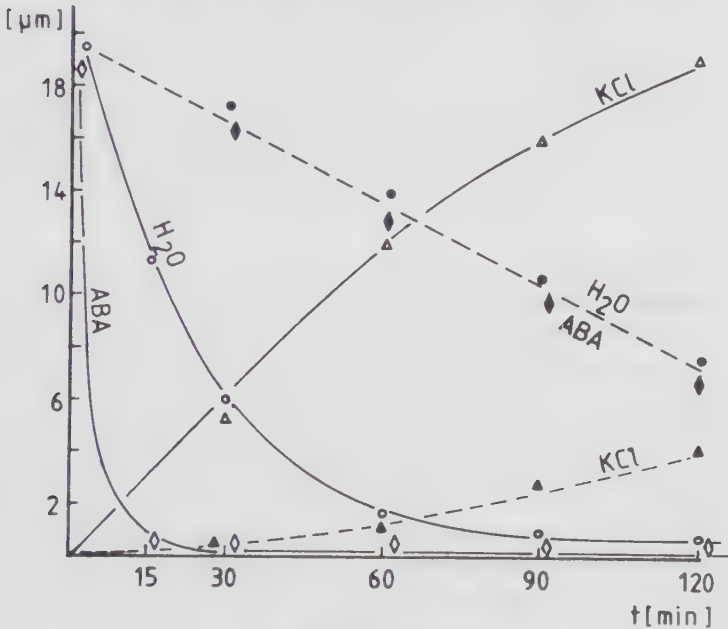


Abb.19:

Temperaturabhängigkeit des Schließens auf H_2O und $\text{ABA } 10^{-4}\text{ M}$ und des Öffnens auf KCl 150 mM der Stomata in isolierten Epidermen von Commelina communis (durchgezogene Linie: Öffnen und Schließen bei 30°C ; gestrichelte Linie: Öffnen und Schließen bei 3.5°C).

3. Einfluß von externen Kaliumionen auf die ABA-Wirkung

Zur Unterscheidung von aktiven und passiven Transportprozessen beim Schließen der Stomata auf H_2O und auf ABA wurden weitere Versuche angestellt. Beruht nämlich das Schließen der Stomata auf passiven Diffusionsprozessen, also einem passiven Export der Kaliumionen entlang dem Konzentrationsgradienten, so müßte die Diffusionsgeschwindigkeit und somit auch die Schließgeschwindigkeit der Stomata, von der äußeren Kaliumionenkonzentration abhängen. Es wurde daher die Abhängigkeit der Schließgeschwindigkeit der Stomata auf H_2O und auf ABA von der Kaliumkonzentration im Außenmedium untersucht.

Die Öffnungsgeschwindigkeit der Stomata frisch isolierter Epidermen hängt von der extern angebotenen Kaliumkonzentration ab. Eine geringe Öffnungsweite kann bei Inkubation auf KCl 20 mM nach einer Stunde beobachtet werden. Mit steigender KCl-Konzentration wird die Öffnungsgeschwindigkeit beschleunigt. Bei ca. 200 mM KCl ist ein Sättigungswert erreicht. Innerhalb von 2 h ergibt sich eine Öffnungsweite von 18-20 μm . Wird dem Inkubationsmedium jedoch ABA 10^{-4} M zugesetzt, so unterbleibt die Stomataöffnung bei den niederen Kaliumkonzentrationen. Lediglich bei Kaliumchloridkonzentrationen über 150 mM zeigt sich nach 90 min eine geringe Öffnung. Bei KCl 200 mM läßt sich nach 2 h eine Öffnungsweite von 3-4 μm feststellen (Abb.20).

Werden Epidermen mit offenen Stomata vom Blatt isoliert und auf reines Wasser transferiert, so schließen die Stomata allmählich und sind nach ca. 60 min vollkommen geschlossen. Dieses auf Wasser induzierte Schließen läßt sich durch steigende externe Kaliumchloridkonzentrationen verlangsamen bzw. ganz verhindern. Bereits 10 mM KCl führen zu langsamerem Schließen und bei 30 mM bleiben die Stomata über längere Zeit offen (Abb.21). Konzentrationen über 100 mM bewirken hingegen noch weiteres Öffnen (Abb.21).

Wie aus Abb. 21 weiter zu ersehen ist, schließen die geöffneten Stomata innerhalb weniger Minuten, wenn dem Inkubationswasser $\text{ABA } 10^{-4} \text{ M}$ zugesetzt wird. Gleichzeitige Zugabe von niederen Kaliumchloridkonzentrationen ändern an diesem Bild nichts. Höhere Konzentrationen, ab ca. 80 mM KCl, verlangsamen aber die Schließgeschwindigkeit, ab ca. KCl 150 mM ist keine signifikante ABA-Wirkung mehr zu erkennen. Die Wirkung ist hierbei für Kaliumchlorid spezifisch, sowohl nichtionische Osmotika, wie Sorbit, als auch Kaliumsalze mit wenig permeablen Anionen, wie Sulfat oder Iminodiacetat, vermögen das durch Wasser oder ABA induzierte Schließen der Stomata nicht oder nur in unwesentlichem Umfang aufzuheben.

Etwas anders verhält es sich allerdings mit den Schließzellen isolierter Epidermen, die im Licht auf 200 mM KCl geöffnet wurden (Abb.22). Wurden nach 2 h Vorinkubation auf KCl 200 mM (die Stomata sind dann auf ca. 20 μm geöffnet), die Epidermen auf H_2O oder $\text{ABA } 10^{-4} \text{ M}$ inkubiert, so war in beiden Fällen die Schließreaktion wesentlich verlangsamt. Auf reines Wasser transferierte Epidermen waren nach 2 h Inkubationszeit noch immer nicht geschlossen (Öffnungsweite ca. 5 μm) und sogar die auf ABA inkubierten Epidermen waren nicht weiter geschlossen. Wird dem Medium wiederum Kaliumchlorid zugesetzt, so wird der Schließprozeß mit steigender Konzentration allmählich aufgehoben, bis bei 150 mM KCl ein stationärer Zustand erreicht wird. Kaliumsulfat konnte diese Hemmung der ABA-Wirkung auch hier nicht erreichen, allerdings führt eine Transferierung der auf KCl geöffneten Epidermen auf 100 mM Kaliumsulfat ebenfalls zu langsamerem Schließen.

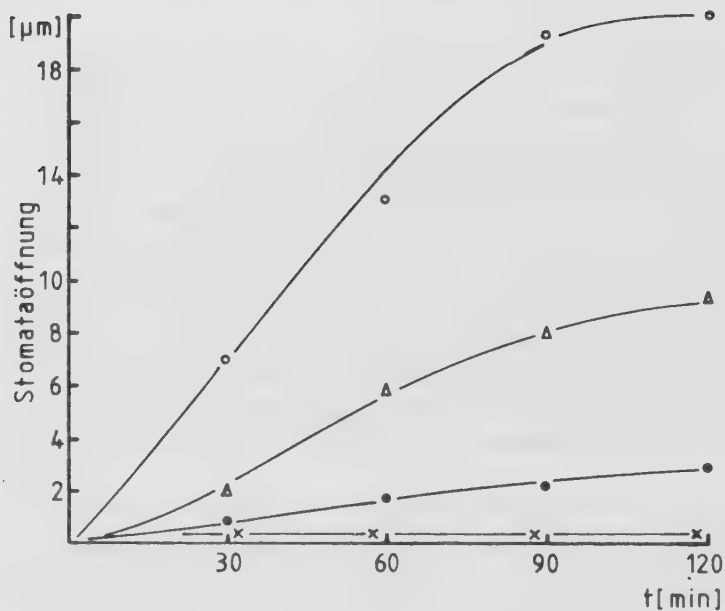


Abb. 20

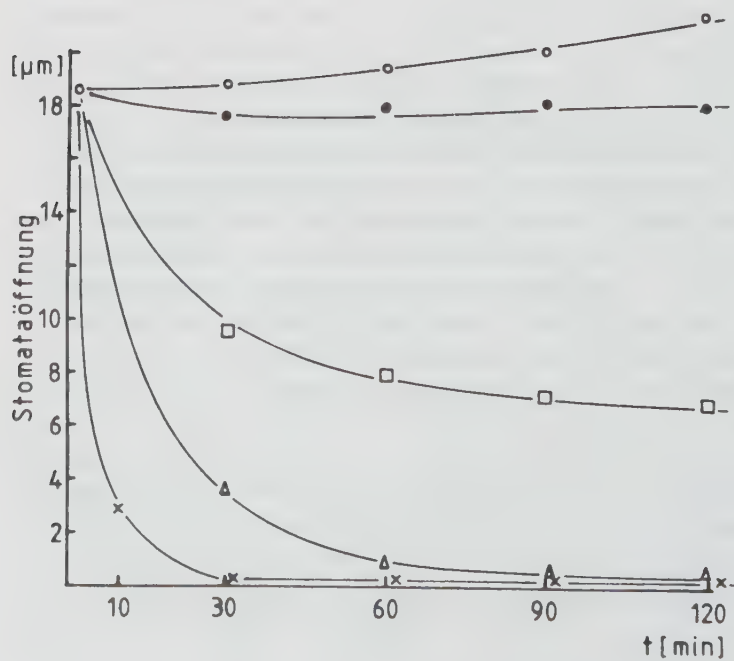


Abb. 21

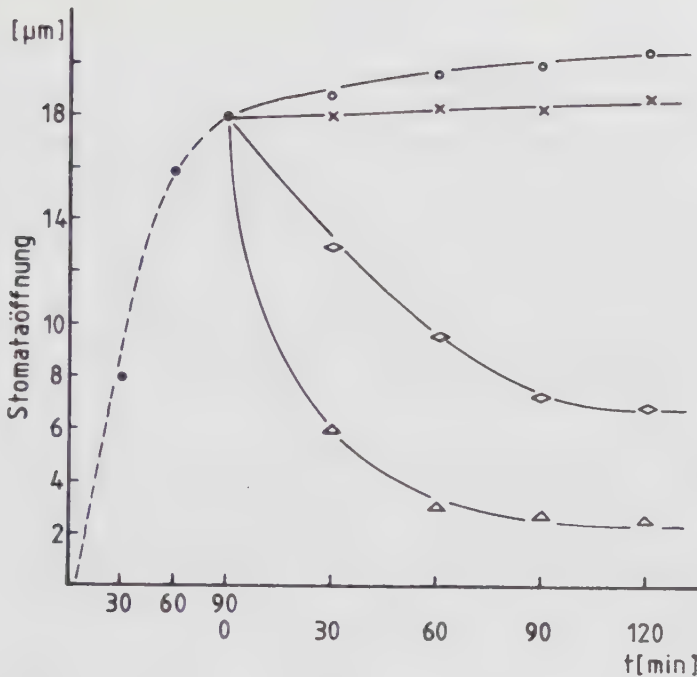


Abb. 22

Abb. 20: Öffnungsverhalten der Stomata in isolierten Epidermen von Commeline communis bei Inkubation auf :
 KCl 150 mM—○; K₂SO₄ 100 mM—△; KCl 200 mM + ABA 10⁻⁴ M—●; H₂O, K₂SO₄ 100 mM + ABA 10⁻⁴ M, ABA 10⁻⁴ M—x.

Abb. 21: Verhalten isolierter Epidermen von Commelina communis, die vom Blatt mit offenen Stomata präpariert wurden, bei Inkubation auf: KCl 200 mM—○; KCl 200 mM + ABA 10⁻⁴ M—●; K₂SO₄ 100 mM—□; H₂O, K₂SO₄ 100 mM + ABA 10⁻⁴ M—△; ABA 10⁻⁴ M—x.

Abb. 22: Verhalten offener Stomata in isolierten Epidermen von Commelina communis nach 90 min Vorinkubation auf KCl 150 mM bei nachfolgender Inkubation auf: KCl 200 mM—○; KCl 200 mM + ABA 10⁻⁴ M—x; K₂SO₄ 100 mM ± ABA 10⁻⁴ M—◇; H₂O ± ABA 10⁻⁴ M—△.

4. Zusammenfassung von Kapitel V

Die Ermittlung der Q_{10} -Werte des Öffnens und Schließens der Stomata läßt einige Schlüsse über die Natur dieser Prozesse zu. Am auffallendsten ist die relativ geringe Beeinflußbarkeit des Schließens auf H_2O durch die Temperatur. Bei einer Temperaturerhöhung um $26.5^{\circ}C$ ergibt sich eine 4-fache Geschwindigkeitserhöhung des Schließens. Der sich daraus errechnete Q_{10} -Wert von 1.6 läßt daher eine mehr passive, physikalische Reaktion erwarten.

Demgegenüber nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit des ABA-katalysierten Schließens mit steigender Temperatur drastisch zu. Bei wiederum $26.5^{\circ}C$ Temperaturerhöhung beobachtet man eine fast 17-fache Steigerung der Schließgeschwindigkeit. Der Q_{10} -Wert von ca. 2.4 gibt Anlaß, an eine enzymatisch katalysierte Reaktion, etwa "facilitated diffusion", zu denken.

Ähnlich verhält es sich auch mit der Öffnung geschlossener Stomata auf 150 mM KCl, auch hier ist eine starke Temperaturabhängigkeit der Öffnungsgeschwindigkeit zu verzeichnen. Der hier ermittelte Q_{10} -Wert von 2.2 deutet ebenfalls auf eine enzymatisch gesteuerte Reaktion hin. Diese Ergebnisse lassen natürlich keine Aussagen über die Natur der protein-katalysierten Prozesse zu.

Hinweise können aber die Versuche zur Hemmbarkeit des Schließens mit extern angebotenen Kaliumchlorid geben. Interessant ist hierbei, daß sich das Schließen auf reinem Wasser bereits durch 30 mM KCl kompensieren läßt, daß aber im Falle des ABA-katalysierten Schließens dagegen 150 mM KCl aufgewandt werden müssen. Zusammen mit den Befunden der

Einbauversuche mit radioaktivem CO_2 läßt sich dieser Effekt durch einen erhöhten Efflux von osmoaktiven Kalium- bzw. Chloridionen aus den Schließzellen ins Medium erklären. Die Hemmung der entsprechenden Schließreaktion würde sich dann durch Kompensation des Kalium- bzw. Chloridefflux erklären.

So können offene, auf Wasser transferierte Stomata, aus dem Medium keine osmoaktiven Ionen mehr aufnehmen und ein durch die Protonenpumpe aufgebauter Protonengradient wäre wirkungslos. Hinzu kommt, daß auch das in den Zellwänden festgehaltene Kalium ebenfalls z.T. an das Inkubationswasser abgegeben wird und sich hier unendlich verdünnt. Die hohe Permeabilität der Schließzellenmembran führt zudem zu einem permanenten passiven Leckstrom an osmoaktiven Ionen (s.auch Kap.III.7.), so daß die Stomata schließen.

Wird jedoch durch steigendes externes Kaliumchloridangebot wieder "Substrat" für die Kaliumaufnahme zur Verfügung gestellt, so kann der Kaliumleckstrom durch Kaliumaufnahme kompensiert werden, was bei etwa 30 mM KCl erreicht ist. Bei dieser Konzentration ist offenbar die Effektivität der Kaliumaufnahme gleich hoch, wie der passive Efflux und damit bleiben die Stomata im gleichen Zustand bzw. können durch noch höheres Kaliumangebot sogar noch weiter öffnen. Der Öffnungsgrad der Stomata ergibt sich somit aus dem Zusammenwirken von Efflux und Kaliumaufnahme.

Daß diese Kompensation des Leckstroms im Falle der Abscisinsäure erst über 150 mM KCl erfolgt, legt wiederum - zusammen mit den $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungsversuchen - den Schluß nahe, daß ABA den Efflux der osmoaktiven Ionen erheblich erhöht, ohne jedoch offensichtlich den Influx zu beeinträchtigen.

Dies zeigt sich eben in der Kompensierbarkeit der ABA-Wirkung durch KCl, was einen noch funktionierenden Kaliumaufnahme-mechanismus voraussetzt. Nur liegt die Grenze zur Efflux-kompensation wesentlich höher, da ja auch ein wesentlich größerer Efflux zu kompensieren ist. Es scheint unwahrscheinlich, daß ein etwa nachlassender epidermaler Gewebedruck für diesen Effekt verantwortlich ist, da zum einen durch nichtionische Osmotika, wie Sorbit, das Schließen nicht zu verhindern ist und zum anderen, die ABA-Reaktion normalerweise so schnell erfolgt, daß zumindest ein anfängliches Schließen beobachtet werden müßte. Ähnliche ABA-Wirkungs-mechanismen fanden durch zum Teil elektrophysiologische Untersuchungen MacRobbie (1981b) und durch Inhibitorversuche und künstliche Membransysteme Gepstein et al. (1983), Lea und Collins (1979) und Kasamo (1981). Daß ABA nicht einfach die Affinität für die Kaliumaufnahme reduziert, zeigt sich darin, daß das Schließen auf H_2O durch ABA zu beschleunigen ist.

Es fällt allerdings auf, daß Stomata, die durch Inkubation auf KCl 200 mM geöffnet wurden, also nicht am intakten Blatt, nur noch geringe ABA-Sensitivität besitzen. Die Schließvorgänge laufen dann auch bei Inkubation auf Wasser sehr langsam ab und spiegeln in keiner Weise die rasche Wirkung der ABA bei intakten Blättern wieder. Möglicherweise wird durch die lange Vorinkubation auf KCl (90 min), die dazu nötig ist, um die Stomata weit zu öffnen, das Epidermisgewebe geschädigt (s.Kap.I). Auch sinkende Membranpotentiale der Stomata in Abhängigkeit von der Inkubationszeit weisen auf diese Schädigung hin (MacRobbie, 1981b). Der nachlassende Gewebedruck der Epidermis- und Nebenzellen würde dann zudem zu einem passiven Öffnen (s.Raschke, 1979) führen, so daß mit oder ohne ABA eingeleitete Schließprozesse nur sehr langsam ablaufen würden.

Eine nicht unbedeutende Rolle der Chloridanionen für die Kaliumionenakkumulation zeigt sich darin, daß sich das Schließen auf Wasser oder ABA durch Kaliumsulfat nicht oder nur in sehr hohen Konzentrationen (im Falle des Schließens auf Wasser) kompensieren läßt. Offensichtlich ist hier die Kaliumaufnahme in Verbindung des Ladungsausgleichs mit Chlorid effizienter und schneller, als über den Umweg der Ladungskompensation mit Malat.

Damit ergibt sich in etwa folgendes Bild für die Schließprozesse: Das Schließen der Stomata auf Wasser erfolgt nach einem mehr passiv-physikalischen Prozeß, etwa durch Diffusion der in den Schließzellen akkumulierten osmoaktiven Ionen entlang dem Konzentrationsgradienten. In vivo könnte dieser Mechanismus durch eine Hemmung der Kaliumaufnahme erfolgen. Da in diesem Fall der Efflux überwiegen würde, könnten die Stomata schließen.

Die Wirkung der ABA läßt sich mit einer enzymatisch katalysierten Erhöhung des Efflux, etwa "facilitated diffusion", der osmoaktiven Ionen beschreiben. Der rasche ABA-katalysierte Efflux kann durch die noch funktionierenden Aufnahmemechanismen nicht mehr kompensiert werden, so daß die Stomata schließen. Dieser Mechanismus wäre auch in vivo denkbar, da nachgewiesen werden konnte (Weiler et al., 1982), daß ABA unter osmotischem Streß in den Schließzellenchloroplasten selbst synthetisiert werden kann.

Die vorliegenden Versuche erlauben nur Aussagen allgemeiner Natur. Zum enzymatischen Mechanismus des Öffnen und Schließens der Stomata und den damit verbundenen Ionenströmen kann nur wenig gesagt werden. Durch Inhibitorversuche sollte im Folgenden versucht werden, diese Probleme weiter zu untersuchen.

VI. Inhibitorversuche

Mehrere Fragestellungen sollten durch Inhibitorversuche einer Klärung nähergebracht werden:

- a) Zwischen Öffnen und Schließen der Stomata und der respiratorischen und photosynthetischen Leistung der Schließzellen besteht zwar grundsätzlich ein Zusammenhang, im Detail ist aber letztlich vieles noch unklar. Die Energieversorgung der nicht über den Calvinzyklus verfügbaren Schließzellen (Raschke, 1979) ist durch zwei Prozesse möglich: Kohlenhydrate werden aus den photosynthetisch aktiven Mesophyllzellen bezogen und über Glykolyse, Citratzyklus und Atmungskette in chemische Energieäquivalente umgewandelt. Es gibt aber auch Hinweise, daß Photosystem I in den Schließzellenplastiden funktionsfähig ist und somit ATP-Gewinnung über zyklische Photophosphorylierung denkbar wäre (Outlaw et al., 1981; Schnabl und Hampp, 1980). Eine Beteiligung dieser Prozesse am Öffnungs- und Schließmechanismus der Stomata sollte durch Einsatz spezifischer Photosynthese- und Atmungsinhibitoren bei Commelina communis nachgewiesen werden.
- b) Unklar ist, ob die Aufnahme von Kaliumionen beim Öffnen über eine Plasmalemma-ATP-ase bewerkstelligt wird und inwieweit die Abgabe von Kalium beim Schließen ebenfalls durch eine ATP-ase katalysiert wird. Es wird heute angenommen, daß der primäre Schritt der Kaliumaufnahme im Aufbau eines Protonengradienten mit Hilfe einer plasmalemmagebundenen ATP-ase besteht (Raschke, 1979). Mit Hilfe spezifischer ATP-ase-Inhibitoren und von Thiolreagenzien sollte ein proteinkatalysierter Öffnungs- und Schließmechanismus nachgewiesen werden.

c) Ist der Protonengradient für die Kaliumaufnahme verantwortlich ? Der zweite Schritt der Kaliumaufnahme würde darin bestehen, daß der durch die ATP-ase aufgebaute Protonengradient (Saftner und Raschke, 1981) und das damit erzeugte negative Schließzellenmembranpotential, für den elektrogenen Transport von Kaliumionen ausgenützt würde. Durch Veränderung der Membranpermeabilität für Kalium, etwa durch Kaliumionophore, wurde dieser Mechanismus untersucht.

1. Voraussetzungen für Inhibitorversuche

Die wirksame Konzentration des Inhibitors hängt von mehreren Faktoren ab. In Wasser schwer lösliche Inhibitoren werden meist als konzentrierte Stammlösung in Methanol oder Aceton gelöst. Die Verdünnung in wässrigem Medium führte zum Teil zu Ausfällungsreaktionen, so daß die wirksame Konzentration niedriger anzusetzen ist, als die tatsächlich eingesetzte. Eine Beeinflussung der entsprechenden Reaktion durch die Lösungsmittel Methanol und Aceton konnte durch entsprechende Vorversuche ausgeschaltet werden.

Die Permeabilität der Inhibitoren muß berücksichtigt werden bzw. gewährleistet sein. Der Transport der Inhibitoren erfolgt über die Zellwand mit ihren negativ geladenen Polygalakturonsäuren. Besonders bei ionischen Hemmstoffen müssen daher zur Überwindung des Donngleichgewichts der Zellwand hohe Konzentrationen angewandt werden. Es wurde daher versucht, möglichst ungeladene Inhibitoren zu verwenden.

Ein weiterer Punkt ist die pH-Abhängigkeit der Inhibitoren. So haben manche Inhibitoren ein unterschiedliches Wirkungsspektrum bei verschiedenem pH (z.B. 2,4-DNP). Es konnten daher nur Hemmstoffe benutzt werden, die beim pH des Inkubationsmediums wirksam waren (pH 5.8).

Ein weiterer zu berücksichtigender Punkt ist die Kinetik der Hemmstoffaufnahme. Versuche mit sehr schnellen Reaktionen, wie die Schließreaktion auf ABA, setzen voraus, daß der Hemmstoff schnell zum Wirkungsort gelangt. Dies gilt natürlich besonders für schwer permeable Verbindungen, so daß unter Umständen eine Vorinkubation mit dem entsprechenden Hemmstoff notwendig ist.

2. Untersuchungen zur Beteiligung energieumsetzender Prozesse an der Stomatabewegung bei *Commelina communis*

Zu diesem Thema liegen bereits zahlreiche Untersuchungen vor (Raschke, 1979). Da die Ergebnisse teils divergierend und teils mit intakten Blättern durchgeführt und zudem die Schließreaktion nur selten einbezogen wurde, sollten hier die Inhibitoren mit isolierten Epidermen im Licht getestet werden.

Allgemein ist zu berücksichtigen, daß die Blockierung der Nachlieferung von Energieäquivalenten nicht notwendigerweise zu einer vollkommenen Blockierung der ionenaufnehmenden Mechanismen führen muß, da der cytoplasmatische Vorrat an ATP durchaus noch zur Versorgung energieverbrauchender Prozesse dienen kann (Goller, Hampp, Ziegler, 1982). Auch Entkoppler setzen den cytoplasmatischen ATP-Vorrat nur teilweise herab.

2.1. Hemmung photosynthetischer Prozesse

Schließzellen verfügen nicht über den Calvinzyklus. Wohl finden sich aber bei den meisten Pflanzen grüne Chloroplasten in den Schließzellen. Grundsätzlich wäre daher auch ATP-Gewinnung über cyclische oder nichtcyclische Phosphorylierung möglich.

Zur Hemmung des photosynthetischen Elektronentransports wurden folgende Inhibitoren verwendet: 3(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-dimethyl-harnstoff (DCMU) zur Hemmung von Photosystem II und

der offenkettigen Phosphorylierung. Es blockiert wahrscheinlich den Elektronentransport zwischen Primärelektronenakzeptor und dem sekundären Elektronenakzeptor (Izawa, 1977). Phenylmercuriacetat (PMA), ein in der Landwirtschaft verwendetes Antitranspirans, diente der allgemeinen Blockade von PS I und PS II und hemmt somit den zyklischen, wie den nicht-zyklischen Elektronentransport (Squire und Jones, 1971). Natriumazid, NaN_3 , diente als Phosphorylierungshemmer und wirkt als Entkoppler.

Wie aus Abb. 23 und Tab.6 zu erkennen ist, hatten die Inhibitoren folgende Wirkungen:

DCMU 10^{-4} M und 10^{-5} M blieb ohne erkennbare Wirkung auf das Öffnen und Schließen der Stomata. Auch die ABA-Wirkung blieb von DCMU unbeeinträchtigt.

PMA 10^{-5} und 10^{-6} M (wasserschwerlöslich, fällt aus methanolischer Lösung in Wasser wieder z.T. aus) hatte eine drastische Wirkung auf Stomata. Bei diesen Konzentrationen verhindert es die Öffnung der Stomata auf KCl vollkommen. Offene, mit PMA behandelte Schließzellen schlossen sehr langsam, gleichgültig ob ABA beigelegt war oder nicht. Allerdings konnte besonders bei der höheren Konzentration nach etwa 30 min eine Verfärbung der Schließzellen, Chloroplastendeformation und Plasmolyse beobachtet werden, so daß eine Schädigung der Zelle anzunehmen ist.

NaN_3 (1 mM) führte zu einer schwachen Öffnungshemmung im Licht; auch die normale Schließreaktion war etwas verlangsamt, während die ABA-Wirkung unbeeinflusst blieb.

2.2. Hemmung der Zellatmung

Zur Untersuchung inwieweit die oxidative Phosphorylierung einen Einfluß auf die Stomatabewegung ausübt, wurde versucht, diese durch die klassischen Entkoppler 2,4-DNP, sowie den Atmungsketteninhibitor Cyanid zu blockieren.

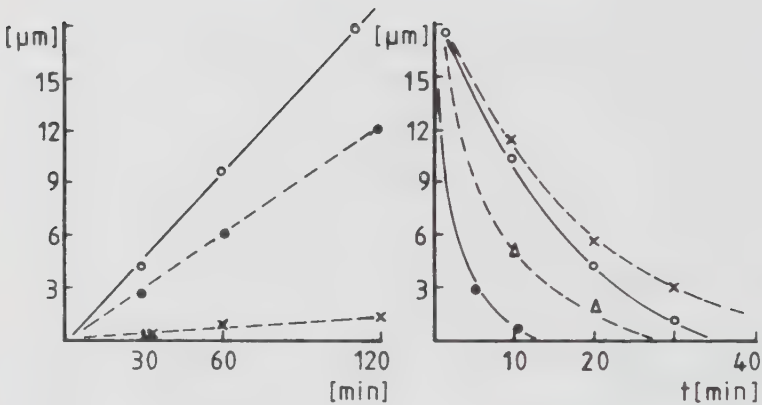


Abb.23:

Einfluß verschiedener Inhibitoren auf Öffnen (linke Abb.) und Schließen (rechte Abb.) der Stomata in isolierten Epidermen von Commelina communis. Linke Abbildung: KCl 150 mM $\pm$ DCMU 10^{-4} M — o; KCl 150 mM + 2,4-DNP 10^{-4} M, + KCN 1 mM, + NaN_3 1 mM — ●; KCl 150 mM + PMA 10^{-5} M — X; rechte Abbildung: H_2O $\pm$ DCMU 10^{-4} M, $\pm$ 2,4-DNP 10^{-4} M, $\pm$ KCN 1 mM — o; ABA 10^{-4} M $\pm$ DCMU, KCN, NaN_3 — ●; H_2O + PMA $\pm$ ABA, H_2O + NaN_3 — - X; ABA 10^{-4} M + DNP 10^{-4} M - - - Δ;

Abb.23 zeigt, daß KCN (1-5 mM) bei isolierten Commelina-epidermen zu einer leichten Öffnungshemmung der Stomata, bei Inkubation auf KCl 150 mM, führt. Das Schließen auf Wasser, ob mit oder ohne ABA, blieb dagegen unbeeinflusst.

2,4-DNP 10^{-4} M hat ebenfalls einen leicht hemmenden Einfluß auf die Öffnungsbewegung. Die ABA-Wirkung ist deutlich verlangsamt.

3. Untersuchungen zur Beteiligung von ATP-asen und thio- reagenziensensitiver Proteine an der Stomatabewegung

Die bis heute in pflanzlichen Organismen gefundenen und in der Literatur diskutierten aktiven Kaliumaufnahme-mechanismen (Poole, 1978) laufen alle primär über eine Protonenpumpe in Form einer membrangebundenen ATP-ase. Im Falle der Stomata wäre daher eine plasmalemmagebundene ATP-ase zu erwarten. Eine Hemmung dieser ATP-ase müßte dann zu einer Hemmung der Stomataöffnung führen.

3.1. Hemmung mitochondrialer ATP-asen

Als wirksamer Inhibitor der mitochondrialen ATP-asen kommt meist N,N-dicyclohexyl-carbodiimid (DCCD) zur Verwendung. Es hemmt hierbei vornehmlich die Ca^{2+} -ATP-asen der inneren Mitochondrienmembran, der Plasmamembran der Thylakoide und auch der Plasmalemmamembran, wahrscheinlich durch kovalente Bindung an einen Asparaginsäurerest der lipophilen Proteinhelix der F_0 -Untereinheit des ATP-ase-Komplexes und blockiert somit den Protonenkanal (Sebald et al., 1980).

In einer Konzentration von 10^{-4} M bleibt DCCD auf die KCl-induzierte Stomataöffnung ohne signifikante Wirkung. Auch das Schließen auf H_2O und die ABA-Wirkung ist unbeeinträchtigt (Abb.24).

3.2. Hemmung plasmalemmagebundener ATP-asen

Als selektiver Inhibitor der plasmamembrangebundenen ATP-asen bei Neurospora und der nichtmitochondrialen Na,K/ATP-asen, speziell Plasmalemma-ATP-asen wirkt Natriumorthovanadat (Jacobs und Taiz, 1980). Die bisher beschriebenen ATP-asen sind entweder DCCD oder Vanadat-sensitiv.

Aus Abb. 24 ist die Wirkung von Vanadat 2 mM auf die Stomatabewegung zu erkennen. Es zeigt sich eine erhebliche Hemmung des Öffnungsvorganges. Auf KCl 150 mM bei pH 5.8 wird mit NaOV nur die halbe Öffnungsweite erreicht, als ohne NaOV. Das Schließen auf Wasser ist ebenfalls verlangsamt, wie auch das durch ABA katalysierte schnelle Schließen.

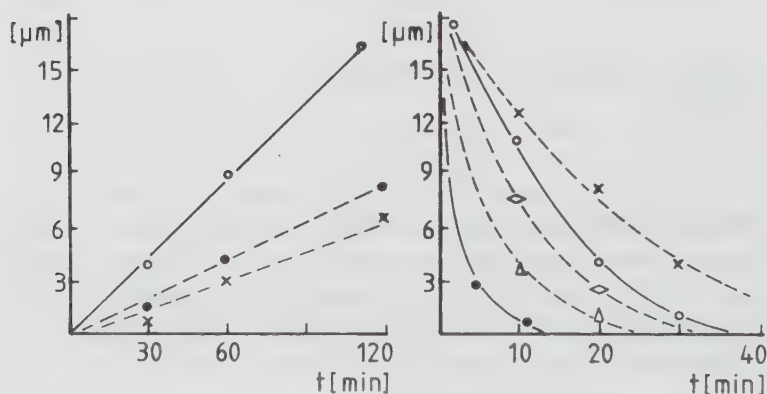


Abb. 24:

Wirkung verschiedener Inhibitoren auf Öffnen (linke Abb.) und Schließen (rechte Abb.) der Stomata in isolierten Epidermen von *Commelina communis*. Linke Abbildung: KCl 150 mM + DCCD, + JAA, + PCMBs —○; KCl 150 mM + NaOV - - - ●; KCl 150 mM + NEM - - - x; rechte Abbildung: H₂O + DCCD, + PCMBs —○; ABA 10⁻⁴ M + DCCD —●; H₂O + NaOV - - - x; ABA 10⁻⁴ + NaOV - - - Δ; ABA 10⁻⁴ M + PCMBs, H₂O + NEM - - - ◇;

3.3. Hemmung durch SH-Reagenzien

Da ATP-asen als Transportproteine Thiolgruppen und Disulfidbrücken enthalten, könnte man durch Blockierung dieser Gruppen ebenfalls eine Hemmung der Kaliumaufnahme erwarten. Als Sulfhydrylgruppenreagenzien fanden N-ethylmaleinimid (NEM), p-chloromercuriphenylsulfonat (PCMBs) und Jodacetamid (JAA) Verwendung.

NEM stellt ein schwer permeables Sulfhydrylgruppenreagenz dar, das kovalente Bindungen spezifisch mit SH-Gruppen bildet. Es hemmt dabei sowohl die Na,K/ATP-ase und die Mg/ATP-ase (im Ochsenhirn), als auch die Ca/ATP-ase des CF_1 im Chloroplasten (Lichtner et al., 1981; Lucas und Alexander, 1980). Es stellt aber auch einen Inhibitor des anorganischen Phosphattransports dar und auch eine Beeinträchtigung der Membranleitfähigkeit für Kalium wird diskutiert (Lichtner et al., 1981).

Einen weiteren effektiven Na,K/ATP-ase-Inhibitor stellt PCMBs dar (Lucas und Alexander, 1980; Izawa und Good, 1969), während JAA ein relativ schwacher Hemmstoff für Na,K/ATP-asen ist. Die Wirkung der SH-Gruppenreagenzien auf die Bewegung der Stomata ist in Abb. 24 dargestellt.

NEM (10^{-5} M) führte zu einer signifikanten Hemmung des Öffnens auf KCl 150 mM, allerdings sind besonders bei höheren Wirkstoffkonzentrationen (10^{-4} M) Beeinträchtigungen der Zellstruktur zu beobachten (Chloroplasten-deformation, Plasmolyse). Die Schließreaktionen werden durch NEM nicht berührt, gleichgültig ob mit oder ohne ABA.

JAA (1 mM) und PCMBs (2 mM) üben auf das Öffnen der Stomata keinen Einfluß aus. Allerdings kann im Falle von PCMBs eine Verlangsamung der Schließreaktion mit ABA beobachtet werden. JAA bleibt ohne Wirkung.

4. Untersuchungen zum Einfluß von Chlorid- und Kalium-permeabilität für das Öffnen und Schließen der Stomata

Die ATP-getriebene Protonenpumpe dient dem Aufbau eines Protonengradienten. Dieser Gradient konnte mehrfach nachgewiesen werden (Raschke, 1979; Penny und Bowling, 1975). Dieser Protonengradient könnte nun die nötige Energie für die Kaliumaufnahme liefern. Mit der Protonenextrusion ist zunächst eine Erhöhung des negativen Membranpotentials der Schließzellen verbunden, wodurch die Aufnahme positiv geladener Ionen erleichtert wird. Bei Vorhandensein entsprechender Kaliumkanäle wäre dann ein Transport von Kaliumionen auch entgegen einen Konzentrationsgradienten möglich.

Der Einsatz von Kaliumionophoren und spezifischen Membranwirkstoffen, die die Membranpermeabilität für bestimmte Ionen beeinflussen, sollte dieser Hypothese nachgehen.

Als Kaliumionophor fand Valinomycin Verwendung. Es bildet spezifisch mit Kalium Einschlußkomplexe, die nach außen lipophil sind und somit leicht in die lipophile Plasmamembran eindringen können (Wilson und Graesser, 1976; Pressmann, 1973). Es handelt sich dabei aber um einen geladenen Komplex, so daß ein Transport von einem elektrischen Gradienten beeinflußt wird. Die Verwendung von Valinomycin kann somit Aufschlüsse über den Einfluß der Kaliumpermeabilität der Membran für die Kaliumaufnahme geben. Mit anderen Worten, wenn der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Kaliumaufnahme die Kaliummembranpermeabilität ist, muß sich durch Valinomycin eine Beschleunigung der Stomataöffnung ergeben. Als Membranmodifikatoren dienten Phloridzin, ein Chalkonglucosid, und sein Aglycon Phloretin. Beide erhöhen den elektroneutralen Efflux von K^+Cl^- , z.B. über die Membranen von Erythrocyten oder Membranvesikeln (Kaplan und

Passow, 1974; Izawa et al., 1966). Der Wirkungsort von Phloridzin und Phloretin ist dabei nur an der Außenseite der Membran, nicht aber an der Innenseite. Sie bewirken dabei nur den Efflux von KCl, fördern aber nicht den Influx (Kaplan und Passow, 1974). Letztere Autoren gehen davon aus, daß die Wirkung von Phloridzin und Phloretin durch Einwirkung auf die Membranlipide zustande kommt.

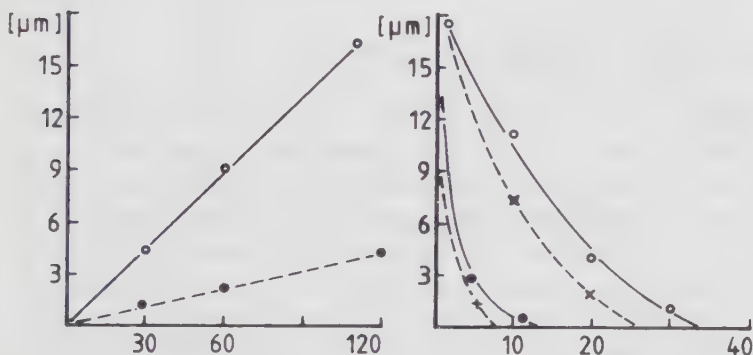


Abb.25:

Einfluß von Valinomycin, Phloridzin und Phloretin auf Öffnen (linke Abb.) und Schließen (rechte Abb.) der Stomata in isolierten Epidermen von Commelina communis. Linke Abbildung: KCl 150 mM $\pm$ Valinomycin —o; KCl 150 mM + Phloretin, Phloridzin - - - ●; rechte Abbildung: H₂O $\pm$ Valinomycin —o; ABA 10⁻⁴ M —●; ABA 10⁻⁴ M + Phloridzin, + Phloretin - - - +; H₂O + Phloridzin, + Phloretin - - - x;

In diesem Zusammenhang müßte hier auch NEM nochmals erwähnt werden, da nach Lichtner et al. (1981) dieses auch eine Erhöhung der Membranleitfähigkeit für Kalium bewirkt.

Die Ergebnisse der Versuche sind in Abb. 25 dargestellt: Valinomycin (10^{-5} M - 10^{-6} M) übt auf das Öffnen und Schließen der Stomata von Commelina communis keinen Einfluß aus.

Phloridzin und Phloretin (10^{-5} - 10^{-6} M) hemmen beide die Stomataöffnung auf 150 mM KCl zu etwa 50 %. Zusätzlich wird das Schließen auf H_2O beschleunigt, auch die ABA-Wirkung ist leicht verstärkt.

5. Zusammenfassung von Kapitel VI

Die Versuche zur Blockierung des photosynthetischen Energieflusses zeigen, daß DCMU, als Hemmstoff von Photosystem II ohne Wirkung auf die Stomatabewegung blieb. Natriumazid als allgemeiner Photophosphorylierungsinhibitor wirkte etwas hemmend. Salicylaldoxime, ein spezifischer Hemmer von Photosystem I zeigte in Untersuchungen von Willmer und Mansfield (1970) ebenfalls Öffnungshemmung. Die starke Hemmung der Stomatabewegung durch PMA ist dagegen wahrscheinlich auf irreversible Schädigung der Schließzellen zurückzuführen und nur bedingt auf eine Hemmung des photosynthetischen Elektronenflusses. Es bestätigt sich damit die Vermutung von anderen Autoren (Raschke, 1979), daß Photosystem II für die Energieversorgung der Stomata keine Rolle spielt, dagegen eine Beteiligung von Photosystem I, also ATP-Gewinnung aus der zyklischen Photophosphorylierung anzunehmen ist. Daß es dabei nicht zu stärkeren Hemmeffekten kommt, weist darauf hin, daß photosynthetische Prozesse an der Stomataöffnung nur zum Teil beteiligt sind. Daneben muß davon ausgegangen werden, daß der endogene cytoplasmatische ATP-Gehalt der Schließzellen durch die Inhibitoren relativ unbeeinflusst bleibt (Goller et al., 1982) und Energieäquivalente auch aus der oxidativen Phosphorylierung stammen können.

Tab.6: Einfluß von verschiedenen Inhibitoren und Wirkstoffen auf die Stomatabewegung von Commelina communis. (Keine Wirkung = $\emptyset$; schwache bis starke Hemmung = -/- -/- ---; schwache bis starke Beschleunigung = +/+ +/+ + +; (+) = Beschleunigung nicht eindeutig nachweisbar .

Inhibitor oder Wirkstoff, Konzentration	Öffnen (KCl)	Schließen (H_2O)	Schließen (ABA)
DCMU, 10^{-4} M	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
PMA, 10^{-6} M	- - -	-	- - -
NaN_3 , 1 mM	-	-	$\emptyset$
KCN, 1-5 mM	-	$\emptyset$	$\emptyset$
2,4-DNP, 10^{-3} M	-	$\emptyset$	-
DCCD, 10^{-4} M	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
NaOV, 2 mM	- -	-	-
JAA, 1 mM	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
NEM, 10^{-5} M	- -	+	$\emptyset$
PCMBs, 2 mM	$\emptyset$	$\emptyset$	-
Valinomycin, 10^{-5} - 10^{-6}	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
Phloridzin, 0.5 mM	- -	+	(+)
Phloretin, 0.5 mM	- -	+	(+)

Die Versuche zur Blockierung der oxidativen Phosphorylierung zeigten aber ebenfalls keine drastischen Effekte auf die Stomatabewegung. Cyanid und 2,4-DNP führen nur zu geringen Hemmungen der Öffnungsbewegung. Es zeigt sich also, daß weder die Blockierung der Photophosphorylierung noch die Blockierung der oxidativen Phosphorylierung allein, die Energieversorgung der ionenaufnehmenden Mechanismen unterbricht, so daß anzunehmen ist, daß beide Systeme der Energiegewinnung in der Zelle als Energiequellen der Stomataöffnung dienen. Dies erscheint auch sinnvoll, zumal ja auch Pflanzen bekannt sind, die über keine grünen Chloroplasten in den Schließzellen verfügen, welche trotzdem voll funktionsfähig sind (Nelson und Mayo, 1975). Auch die Möglichkeit der Dunkelöffnung wäre hier anzuführen, wenn auch in diesem Fall die Öffnungsreaktion etwas langsamer abläuft. Der Energiegewinn kann im Dunkeln nur aus der oxidativen Phosphorylierung stammen.

Die Versuche zeigen auch, daß der endogen vorhandene Energievorrat für eine Stomataöffnung noch ausreichend ist. Dies wird auch dadurch bestätigt, daß die Dunkelöffnung der Stomata, auch durch Inhibitoren der oxidativen Phosphorylierung nur schwach zu hemmen ist (Willmer und Manfield, 1970). Neuere Untersuchungen haben zudem gezeigt, daß der cytoplasmatische ATP-Spiegel nur geringen hell-dunkel-Schwankungen unterworfen ist (Goller, Hampp und Ziegler, 1982).

Allen Versuchen war gemein, daß die Schließgeschwindigkeit auf H_2O keine signifikanten Hemmungen zeigt. Die Hemmung des Schließens durch PMA dürfte nicht durch eine Hemmung von aktiven Mechanismen zustande kommen. Die Zellschädigungen durch PMA weisen eher darauf hin, daß dieser Effekt auf

den nachlassenden epidermalen Gewebedruck zurückzuführen ist. Auch die Verlangsamung des Schließens durch NaN_3 dürfte auf diesem Effekt beruhen, da nach etwa 30 min die Epidermiszellen plasmolysiert sind. Eine von mehreren Autoren beobachtete totale Inhibition des Schließens (Walker und Zelitch, 1963; Pemadasa und Jeyaseelau, 1977) konnte jedenfalls bei isolierten Commelinaepidermen nicht beobachtet werden.

Deutlich hemmbar war jedoch das schnelle Schließen auf $\text{ABA } 10^{-4} \text{ M}$ durch 2,4-DNP und PMA. Hier unterschieden sich die Schließgeschwindigkeiten kaum von den auf reinem Wasser schließenden Stomata. Dies deutet darauf hin, daß es sich im Falle des ABA-katalysierten Schließens um einen energetisch aufwendigeren, gesonderten Prozeß handelt, denn gerade im Falle von DNP wird ja nur die ABA-Wirkung betroffen, nicht aber das Schließen auf normalem Wasser. Das zeigt, daß DNP hier spezifisch wirkt und nicht unbedingt auf seine entkoppelnde Wirkung zurückzuführen ist. Auch der PMA-Wirkung kann Bedeutung zukommen, da nach 5 min noch keine Plasmolyse der Nebenzellen beobachtet werden kann und sich somit zumindest eine kurzzeitige Schließbewegung beobachten lassen müßte.

Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß der durch Wasser induzierte Schließprozeß wenig abhängig von der Energieversorgung der Schließzellen scheint, während das ABA-katalysierte Schließen eine Kopplung an die Energieversorgung der Stomata erkennen läßt und komplexerer Natur zu sein scheint.

Die Versuche zur Blockierung der ATP-asen weisen auf eine Vanadat-sensitive plasmalemmagebundene Na,K/ATP-ase hin. Die geringe Hemmung durch DCCD, dem Inhibitor der mitochond-

drialen ATP-asen, dürfte ihre Ursachen in der Hemmung der Phosphorylierung haben. Auch das ABA-katalysierte Schließen ist Vanadat-sensitiv, womit die Beteiligung einer plasmalemmagebundenen ATP-ase vermutet werden kann. Das Schließen auf Wasser bleibt durch DCCD unbeeinträchtigt, während NaOV das Schließen verlangsamt. Letzteres liegt entweder an einer Proteinkatalyse oder an einer Schädigung des epidermalen Gewebes. Auch die Versuche mit NEM und PCMBS bestätigen dieses Bild. Der Ionenaufnahmemechanismus ist NEM-sensitiv, läßt also auf ein Transportprotein schließen. Die ABA-Wirkung wird durch NEM allerdings nicht beeinflusst, was aber darin liegen mag, daß NEM ein schwer permeabler Inhibitor ist, der vielleicht erst an der Innenseite der Membran wirkt. ABA könnte dann schon in Wirkung getreten sein, bevor NEM am Wirkungsort angekommen ist.

PCMBS wirkt auf die ABA-Reaktion dagegen verlangsamend, beeinträchtigt aber nicht die Öffnungsgeschwindigkeit. Dies kann wiederum als Indiz dafür gelten, daß der schnelle Export von Ionen durch ABA, durch ein anderes System katalysiert wird, als das, welches für die Aufnahmemechanismen verantwortlich ist.

Die Versuche mit Valinomycin zeigen keinen Einfluß auf die Stomatabewegung und weisen somit darauf hin, daß die Kaliumaufnahme nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Schließzellenöffnung ist. Die Membranleitfähigkeit für Kalium muß vielmehr die Folge eines Primärprozesses sein, der erst sekundär die Kaliumaufnahme bewirkt. Bei diesem Sekundärschritt spielt die Kaliumpermeabilität eine geringe Rolle, da durch Valinomycin keine schnellere Stomataöffnung stattfindet. Tatsächlich weisen die Untersuchungen von Saftner und Raschke (1981) darauf hin, daß die Kaliumpermeabilität der Schließzellenmembran relativ hoch ist.

Es erscheint daher gleichfalls einleuchtend, daß auch die Schließreaktion durch Valinomycin unbeeinflußt bleibt. Es muß angenommen werden, daß beim Schließen Kalium entweder über einen Counterport, etwa mit Protonen, oder über einen Cotransport, etwa mit Chlorid oder Malat als Anion, exportiert wird, da ja Valinomycin weder die Permeabilität für Protonen, noch für Chlorid und Malat erhöht und somit das Anion ein geschwindigkeitsbestimmender Faktor ist.

Dagegen wirken Phloridzin und Phloretin auf das Öffnen der Stomata hemmend und auf Schließen beschleunigend. Das zeigt, daß offensichtlich die Chlorid- (und damit wohl auch die Malat-)permeabilität für Öffnen und Schließen der Stomata eine große Rolle spielen. Denn durch die beiden Wirkstoffe wird ja z.B. auch die Chloridpermeabilität erhöht. Einem passiven elektroneutralen Efflux von KCl steht somit nichts im Wege. Das heißt, der durch Phloridzin und Phloretin induzierte KCl-Efflux kann beim Öffnen durch die Ionenaufnahmemechanismen nicht mehr voll kompensiert werden (Öffnungshemmung) bzw. führt beim Schließen zu einem beschleunigten Efflux (Schließbeschleunigung auf H_2O und ABA). Auch das etwas beschleunigte Schließen der Stomata auf Wasser + NEM mag vielleicht an einer Erhöhung der Anionenpermeabilität der Membran durch NEM liegen (Lichtner et al., 1981).

Letztere Versuche weisen darauf hin, daß der Anionenpermeabilität beim Öffnen und Schließen der Stomata entscheidende Bedeutung zukommt.

VII. Calciumwirkung

1. Hemmung der Stomataöffnung bei *Commelina communis* durch Calcium

Schon seit einiger Zeit ist bekannt, daß Calciumionen einen hemmenden Effekt auf die Schließzellenbewegung von *Commelina communis* ausüben können (Willmer und Mansfield, 1969; Fischer, 1972; Fujino, 1967). Eine Erklärung wurde allerdings nicht angeboten. Die Calciumwirkung wurde durch Zusatz von Calciumionen zum Inkubationsmedium nochmals untersucht, um die Ergebnisse mit neueren Erkenntnissen der Calciumwirkung zu vereinbaren.

Die Versuche wurden mit isolierten Epidermen von *Commelina communis* durchgeführt. Die Schließzellen der isolierten Epidermen wurden auf KCl 150 mM inkubiert und der Einfluß von Ca^{2+} -Ionen auf die Öffnungsreaktion studiert. Wie Abb. 26 zeigt, bewirkt bereits 1 mM CaCl_2 im Inkubationsmedium eine fast vollständige Hemmung des Öffnungsvorgangs. Die Hemmung war bei 10^{-4} M schwächer und erst bei 10^{-6} M nicht mehr nachzuweisen und das auch dann, wenn die Versuche in CO_2 -freiem Medium durchgeführt wurden.

2. Beschleunigung des Schließens der Stomata von *Commelina communis* durch Calciumionen

Auch der Schließmechanismus wird durch Calcium beeinflusst. Werden die Stomata durch Belichtung der ganzen Pflanze am intakten Blatt geöffnet, die Epidermen anschließend isoliert und auf Wasser übertragen, so schließen die Stomata in der Regel innerhalb einer halben Stunde. Wird dem Inkubationswasser wiederum CaCl_2 1 mM zugesetzt, so kommt es zu einer beschleunigten Schließreaktion innerhalb etwa einer Viertelstunde. Spezielle histochemische Kaliumfärbungen zeigen nach

dieser Zeit kein Kalium in den Schließzellen, während die nur auf Wasser inkubierten Stomata noch dick schwarz gefärbt sind und damit auf Kaliumakkumulation hinweisen (Abb.27). Die Wirkung der ABA bleibt durch Calcium offenbar unbeeinflusst, offene Stomata sind bei Inkubation auf $10^{-4}M$ ABA + $CaCl_2$ 1 mM innerhalb weniger Minuten geschlossen.

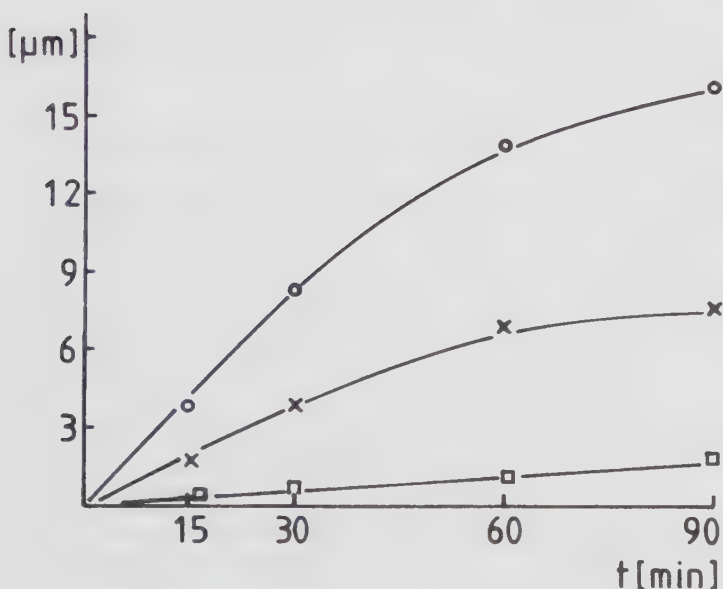


Abb.26:

Einfluß von Calciumionen auf das Öffnen der Stomata

in isolierten Epidermen von Commelina communis:

KCl 150 mM $\pm$ TFA 10^{-5} M, KCl 150 mM + $CaCl_2$ 1 mM + EGTA 5 mM —○; KCl 150 mM + $CaCl_2$ 1 mM + TFA 10^{-5} M —x; KCl 150 mM + $CaCl_2$ 1 mM $\pm$ EGTA 1 mM —□;

3. Einfluß von EGTA, Trifluoperazine und Rutheniumrot auf die Hemmung der Stomataöffnung durch Calcium

Die Hemmung der Stomataöffnung durch Calciumionen konnte durch EGTA aufgehoben werden. Wurde dem Inkubationsmedium 5 mM EGTA, das als Calciumkomplexator wirkt, beigegeben, so verlief die Öffnungsreaktion der Stomata normal (Abb.26). 1 mM EGTA beeinträchtigt die Calciumwirkung aber nicht mehr, fördert aber auch die Öffnungsreaktion nicht.

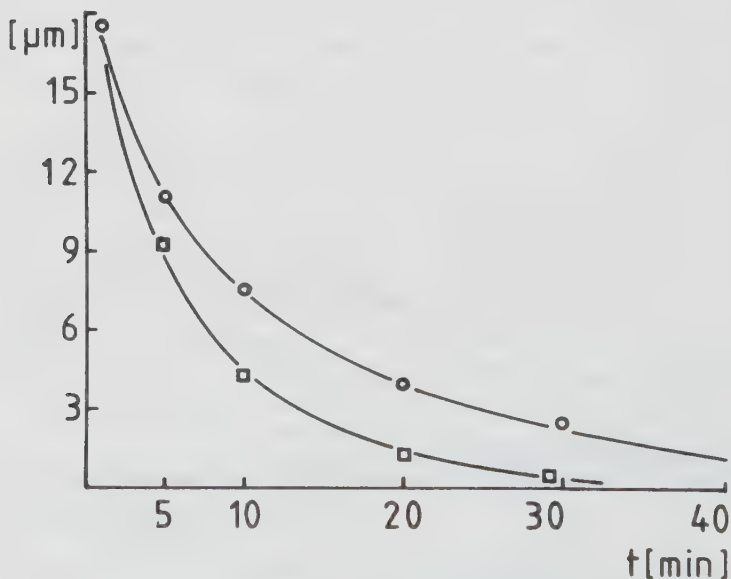


Abb.27:

Einfluß von 1 mM CaCl_2 auf das Schließen der Stomata
von Commelina communis: H_2O —○; $\text{H}_2\text{O} + \text{CaCl}_2$ 1 mM —□;

Wie aus Abb. 26 weiter zu ersehen ist, konnte durch Zugabe von 10^{-5} M Trifluoperazine (TFA), einem antipsychotischen Tranquilizer, ein deutliches Nachlassen der Calciumhemmung

beobachtet werden, obgleich nach einiger Zeit (> 45 min) Chloroplastendeformationen beobachtet wurden. Diese Erscheinung war bei 10^{-4} M TFA besonders stark. Sowohl EGTA, als auch TFA beeinflussten aber das Öffnen auf KCl allein nicht, zumindest innerhalb der ersten 30 min.

Keinerlei Beeinflussung der Calciumhemmung ließ sich durch Rutheniumrot 10^{-4} M erreichen, von dem man weiß, daß es einen Inhibitor der aktiven Calciumaufnahme über einen Uniport in Mitochondrien darstellt (Crompton et al., 1976).

4. Zusammenfassung von Kapitel VII

Richtungsweisende Ergebnisse über die physiologische Rolle von Calcium wurden gerade die letzten Jahre erzielt und sollen zur Erklärung der Öffnungshemmung der Stomata durch Calciumionen herangezogen werden. Es zeigte sich, daß dem Calcium eine Schlüsselrolle in der Regulation vielfältiger cellullärer Prozesse zukommt. Bei Pflanzen vermutet man Eingriffe in wachstumsbedingte Prozesse (z.B. Zellstreckung), Phototaxis, seismonastische Bewegungen der Blätter, Regulation von Enzymaktivitäten (z.B. Pyruvatkinase) u.a.m.

In der Zelle selbst gibt es eine Reihe calciumbindender Proteine, wobei wiederum dem Protein Calmodulin eine besondere Stellung zukommt. Der Ca^{2+} -Calmodulinkomplex stellt eine stoffwechselaktive Form des Calcium dar, der dann in eine Reihe regulatorischer Prozesse der Zelle eingreift. Entscheidend ist dabei die cytoplasmatische Konzentration des Komplexes (Wai Yiu Cheung, 1980). Diese hängt aber von Influx und Efflux der Calciumionen ab, so daß der Regulation der cytoplasmatischen Calcium-

konzentration eine große Bedeutung zukommt. An der Regulation sind aktive Transportprozesse beteiligt, da die apoplastische Ca^{2+} -Konzentration mit 10^{-4} - 10^{-5} M um ein Vielfaches höher ist, als die cytoplasmatische von 10^{-8} - 10^{-6} M (Martonosi, 1980). Zudem erfolgt ein elektrogener, passiver Influx von Calciumionen über in der Oberfläche der Plasmalemma-membran liegenden Calciumkanälen. Für die Konstanthaltung des cytoplasmatischen Calciumspiegels ist wahrscheinlich Calmodulin-Calcium verantwortlich, das bei erhöhtem Calciumpegel das Signal für entsprechende Calcium-pumpen gibt. Die Zelle bedient sich zur Entfernung der Calciumionen mehrerer Methoden. So kann Calcium intracellulär kompartimentiert werden, z.B. durch Transport in Mitochondrien und endoplasmatisches Reticulum (Strobant und Scarborough, 1979), als auch durch entsprechende Transportmechanismen über die Plasmalemma-membran in den Apoplasten befördert werden.

Nach heutiger Kenntnis werden dabei zwei mögliche Pump-mechanismen diskutiert:

- a) Transport über eine $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ -induzierte ATP-ase, die in pflanzlichen Membranvesikeln nachgewiesen werden konnte (Schatzmann, 1975; Vicenci und Larsen, 1980),
- b) Na^+ , $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ und $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Antiportsysteme, die den elektrochemischen Gradienten von Na, K oder von H^+ für die Calciumtranslokation verwenden (Racker, 1980; Hager und Hermsdorf, 1981; Strobant et al., 1980).

Diese Erkenntnisse lassen sich ganz gut mit der Hemmung des Öffnens der Stomata durch Calciumionen in Einklang bringen. Zunächst ist festzustellen, daß die in vitro-Konzentration von 1 mM Calciumchlorid eine etwa 100-fach höhere Konzentration als in vivo darstellt. Es kann daher davon ausgegangen werden, daß infolge des hohen Calciumdiffusionsgradienten, ein erhöhter passiver Calciuminflux erfolgt, was zu einer Erhöhung der cytoplasmatischen Calciumkonzentration führt. Da dies eine einseitige Ladungsverschiebung darstellt, könnte ein durch den Calciumgradienten getriebenes Austauschsystem in Aktion treten, das Protonen oder Kaliumionen im Austausch mit Calciumionen nach außen befördert. Im Falle der Schließzellen würde durch so einen Mechanismus die Kaliumaufnahme gestört.

Die Entfernung der Calciumionen aus der Zelle muß aktiv, vermutlich über ATP-getriebene Pumpen stattfinden. Sie bewirken, daß Protonen in die Zelle gepumpt werden und Calciumionen im Gegenzug exportiert werden. Der zum Öffnen der Stomata notwendige Protonengradient würde auch durch diesen Mechanismus wieder abgebaut und würde zu einer Hemmung der Kaliumaufnahme führen.

Eine zusätzliche Ursache der Ca^{2+} -Hemmung könnte auch in einer Hemmung des Anionentransportes bestehen. So wird von Hager und Helmle (1981) ein ATP-getriebenes H^+/Cl^- -Cotransportsystem beschrieben, das in mikrosomalen Membranvesikeln von Maiskoleoptilen nachgewiesen werden konnte. Diese ATP-ase ist sehr spezifisch durch Calciumionen hemmbar, was im Falle der Stomata bedeuten würde, daß für aufgenommene Kaliumionen kein Chlorid zur Ladungskompensation zur Verfügung steht und diese nur durch endogen

synthetisiertes Malat kompensiert werden können, was aber zu einer geringeren Stomataöffnung führt.

Die angeführten Mechanismen lassen auch die Beschleunigung des Schließens der Stomata durch Calcium erklären. Die hohe intracelluläre Kaliumkonzentration bei offenen Stomata macht einen Calciuminflux durch ein Calcium/Kalium-Antiportsystem besonders leicht, da zwei Konzentrationsgradienten abgebaut werden. Das aufgenommene Ca^{2+} sollte dann über einen aktiven $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Antiport wieder heraus transportiert werden, was einen Abbau des Protonengradienten und einen Netto-Efflux der Kaliumionen bedingt. Die möglichen Calciumtransportmechanismen sind in Abb. 28 schematisch dargestellt.

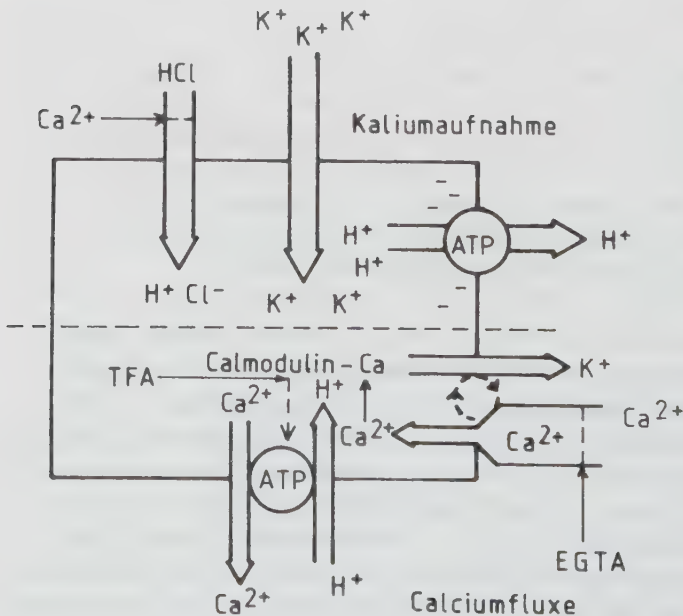


Abb.28:

Modell zur Kaliumaufnahme und zur Calciumwirkung bei Schließzellen von Commelina communis (nähere Erläuterungen im Text).

Wodurch ist nun die Aufhebung der Calciumhemmung durch TFA und EGTA zu erklären. EGTA stellt einen spezifischen Chelator für Calcium dar, so daß anzunehmen ist, daß der EGTA-Calcium-Komplex nicht mehr in die Calciumkanäle paßt, bzw. keine Affinität mehr dafür vorhanden ist. Calcium-induzierte Transport- und Austauschprozesse brauchen daher nicht mehr ausgelöst werden, eine Hemmung der Stomataöffnung tritt nicht mehr ein.

Ähnlich verhält es sich bei der teilweisen Aufhebung der Calciumhemmung durch TFA, das mit hoher Affinität an Calmodulin gebunden wird, aber keinen stoffwechselaktiven Komplex mehr darstellt. Der evtl. Calmodulin-Calcium-gesteuerte Calciumexkretionsmechanismus kann dann nicht mehr in Kraft treten und der für die Stomataöffnung nötige Protonengradient wird nicht abgebaut, so daß auch die Hemmung der Stomataöffnung durch Calcium zumindest zum Teil aufgehoben wird. Ein passiver Effekt von TFA, etwa durch Schädigung des epidermalen Gewebes, scheint zumindest während der ersten 30 min Inkubationszeit nicht der Fall zu sein, da Kontrollversuche ohne Calcium, eine normale Öffnung der Schließzellen auf 150 mM KCl zur Folge hatte.

Rutheniumrot, das die Calciumkanäle der Mitochondrien blockiert, blieb ohne Einfluß auf die Calciumwirkung. Das liegt daran, daß Rutheniumrot nur einen Ca^{2+} -Uniport hemmt, der offenbar hier nicht vorliegt. Auch bei Erythrocyten beeinflusst Rutheniumrot die Calciumfluxe nicht (Schatzmann, 1975) und bei gekoppelten Calciumfluxen, etwa $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^{+}$ -Austausch ist es ebenfalls nicht wirksam.

Vielfach wurde die Wirkung der Calciumionen, besonders im Hinblick auf die Wirkung der Auxine, auch mit der Elastizität der Zellwand in Verbindung gebracht. So

wurde vermutet (Raschke, 1979), daß Calciumionen besonders fest an die sauren Gruppen der Polygalakturonsäuren der Zellwand gebunden werden, somit die Ionenaustauschfähigkeit der Zellwand verloren geht. Eine mit der Protonierung der Zellwand evtl. verbundene Erhöhung der Zellwandelastizität kann dann nicht mehr stattfinden. In Bezug auf die Stomata wäre die Stomataöffnung dann erschwert. Dem widerspricht aber die Schließbeschleunigung der Stomata durch Calcium, was ja eine elastische Zellwand voraussetzt.

Ebenfalls unwahrscheinlich erscheint eine Hemmung des Öffnungsmechanismus der Stomata über einen enzymatischen Mechanismus, etwa einer Hemmung der Pyruvatkinase oder der PEP-Carboxylase (Gavalas und Manetas, 1980), da diese nur indirekt mit den Aufnahmemechanismen in Zusammenhang gebracht werden können.

Die Versuche legen daher nahe, daß es sich bei der Hemmung der Öffnungsmechanismen der Stomata durch Calciumionen um konkurrierende Ionenströme handelt, die getrieben durch das hohe in vitro Calciumdiffusionspotential und aktiver Calciumexportmechanismen zugunsten des Calciums verlaufen.

VIII. Zusammenfassende Diskussion

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit befaßt sich mit der Relevanz der Versuche mit isolierten Epidermen in Bezug auf das in vivo-System. Anhand verschiedener Färbemethoden und durch $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungsversuche konnte nachgewiesen werden, daß die isolierten Epidermen mit zunehmender Versuchsdauer durch einen offensichtlich passiven Efflux

beträchtliche Mengen an Metaboliten und auch an osmotisch aktiven Ionen verlieren. Es muß daher bei in vitro-Versuchen von niedrigeren cellulären Ionenkonzentrationen ausgegangen werden, als sie in vivo bestehen. Zusätzlich zeigt sich, daß Neben- und Epidermiszellen einem intensiveren Efflux unterliegen als die Schließzellen selbst. Bei längeren Versuchszeiten mit isolierten Epidermen ergeben sich dadurch Konsequenzen für das beobachtbare Öffnen und Schließen der Stomata. So muß einerseits bereits bei geringem Anstieg des osmotischen Wertes der Schließzellen ein Öffnen erfolgen, andererseits führt der nachlassende epidermale Gewebedruck auch zu einer langsameren, bis ganz unterbleibenden Schließreaktion.

Die weiteren Untersuchungen befassen sich mit dem Kohlenhydratstoffwechsel der Schließzellen. Versuche mit isolierten Schließzellen bestätigten, wie auch schon in der Literatur gezeigt (Raschke, 1979), daß die kohlenstofffixierende Aktivität der Epidermis ausschließlich auf die Stomata beschränkt ist. Als Hauptfixierungsprodukt tritt anfänglich Malat auf, das einerseits als Anion für importierte Kaliumionen und andererseits als Protonenquelle beim Öffnen der Stomata benötigt wird. Sowohl durch $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen, als auch durch Inhibitorversuche und Enzymnachweise in der Epidermis, konnte weiter gezeigt werden, daß die Schließzellen nicht über den Stoffwechselweg des Calvinzyklus verfügen und damit die CO_2 -Fixierung vielmehr über einen CAM-ähnlichen Mechanismus verläuft. Als weitere wichtige Fixierungsprodukte finden sich neben organischen Säuren und Aminosäuren auch verschiedene Zucker, insbesondere Saccharose. Das Auftreten dieser Zucker ist, wie sich auch durch enzymatische Untersuchungen nachweisen ließ, auf Gluconeogenese zurückzuführen. Für Commelina communis konnte gezeigt werden, daß dieser

Prozeß lichtabhängig ist und daher nur im Licht abläuft. Das bedeutet, daß während der Nacht primärfixiertes Malat nicht weitermetabolisiert und daher angehäuft wird, während am Tage ein Kreislauf der Metaboliten von Stärke über Phosphoenolpyruvat, Malat und zurück über Pyruvat, Phosphoenolpyruvat in der Gluconeogenese wiederum zu Stärke erfolgt. Auch Outlaw und Manchester (1979) konnten bei Vicia faba erhöhte epidermale Zuckerwerte im Licht nachweisen. Der Sinn dieses Mechanismus liegt vielleicht in der Bereitstellung einer ausreichenden Protonen- bzw. Anionenquelle zu Beginn der Lichtphase und somit auch der Öffnungsphase der Stomata. Daneben könnte allerdings zum Teil auch die wieder von MacRobbie (1981a) vertretene Vermutung zutreffen, daß die im Licht synthetisierten Zucker auch osmotische Funktionen haben. Die Hemmung der Gluconeogenese ist im Dunkeln möglicherweise auf das lichtinduzierte Enzym Pyruvat-Phosphat-Dikinase zurückzuführen, das von Schnabl (1981) für Vicia faba nachgewiesen werden konnte. Auch Phosphoenolpyruvatcarboxykinase, die ebenfalls die Wiederaufbereitung von PEP katalysiert, konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, ist aber während der Dunkelphase entweder ebenfalls inaktiv oder nur in geringem Umfange vorhanden. Die Neusynthese von Stärke ist dagegen während der Dunkelphase der Stomata nicht behindert (Pallas, 1964), da davon auszugehen ist, daß diese aus Kohlenhydraten synthetisiert wird, die von den Mesophyllzellen angeliefert werden (Raschke und Dittrich, 1977).

Die hier vorliegenden Untersuchungen lassen auch einige Aussagen über die Ionenaufnehmenden Mechanismen zu.

Die zur Stomataöffnung notwendige Kaliumakkumulation in den Schließzellen setzt Ionentransportmechanismen voraus, die entgegen einem Konzentrationsgradienten verlaufen und

damit Energie verbrauchen. In Inhibitorversuchen konnte eine gewisse Abhängigkeit der Stomataöffnung von den energieliefernden Prozessen der Atmung und Photosynthese gezeigt werden. ATP-Gewinnung aus der Photosynthese beschränkt sich dabei offensichtlich auf die cyclische Photophosphorylierung und bestätigt die Ergebnisse von Schnabl und Hampp (1980). Der Bedarf an Energieäquivalenten für die Öffnungsmechanismen stammt aus dem cytoplasmatischen ATP-Vorrat, der sowohl durch die Prozesse der cyclischen Phosphorylierung, als auch der Atmungskettenphosphorylierung gespeist wird und nur geringen Schwankungen, etwa durch Dunkelheit, unterworfen ist (Goller et al., 1982; Miller und Spanswick, 1977). Dadurch erklärt sich wahrscheinlich der relativ geringe Einfluß der Atmungs- und Photosyntheseinhibitoren auf die Stomataöffnung.

Der eigentliche energieverbrauchende Schritt der Kaliumaufnahme ist offensichtlich in einer ATP-ase zu sehen. So sind fast alle bisher beschriebenen K, Na-Transportmechanismen in der Pflanzenphysiologie durch entsprechende ATP-asen gesteuert (Poole, 1978). Der durch die ATP-asen katalysierte Protonentransport bedingt eine Protonen- und Ladungspolarisierung, die sich wiederum in einem elektrischen Potential (Membranpotential) äußert. Dies wiederum kann in Arbeit, zum Transport etwa von Kalium entgegen einem Konzentrationsgradienten, umgewandelt werden.

Auch bei Schließzellen konnte eine Protonenextrusion (Raschke, 1979) und externe Ansäuerung (Penny und Bowling, 1974) beim Öffnen beobachtet werden.

Die Beteiligung von ATP-asen an diesem Prozeß konnte in den vorliegenden Untersuchungen gezeigt werden, wobei an eine plasmalemmagebundene vanadatsensitive Na,K-ATP-ase

zu denken ist (Jacobs und Taiz, 1980). Auch die Versuche zur Temperaturabhängigkeit des Öffnens der Stomata weisen auf die Beteiligung einer proteinkatalysierten Komponente hin. Es kann daher davon ausgegangen werden, daß auch bei den Schließzellen der Primärschritt der Kaliumaufnahme im Aufbau eines Protonengradienten durch aktive Protonenextrusion über eine ATP-ase besteht. Als interner Protonenlieferant dürfte dabei Malat dienen, das durch Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat, meist in ausreichender Menge zur Verfügung steht.

Das durch die Protonenextrusion aufgebaute erhöhte, intern negative Membranpotential kann als der Motor der Kaliumaufnahme betrachtet werden: die vorwiegend im Apoplasten vorhandenen Kaliumkationen folgen dem elektrischen Gradienten. Die Kaliumaufnahme scheint nicht geschwindigkeitsbestimmend zu sein, was sich aus den vorliegenden Versuchen mit dem Ionophor Valinomycin ergibt. Arntzen et al. (1973) konnten dies auch für *Zea mays* bestätigen und Saftner und Raschke (1982) konnten durch elektrophysiologische Untersuchungen eine hohe SZ-Membranleitfähigkeit für Kalium feststellen. Somit sind die Kaliumionen als weitgehend frei permeable Ionen anzusehen, die passiv dem durch die ATP-asen aufgebauten elektrischen Gradienten folgen. Die Effektivität der Kaliumaufnahme und damit der Stomataöffnung wird also nur durch die Größe des Membranpotentials bestimmt.

Unklarheiten bestehen immer noch über die Natur des ladungskompensierenden Anions der importierten Kaliumionen. Diese Rolle kann einerseits das Malatanion oder das Chloridanion spielen. In zahlreichen Untersuchungen (Raschke, 1979) konnte gezeigt werden, daß, abhängig von der Pflanzenart, Chlorid und Malat in unterschiedlichen Verhältnissen der Ladungskompensation dienen. So sind Pflanzen bekannt, wie etwa

Alliumarten, die als Anion nur Chlorid aufweisen (Schnabl und Ziegler, 1976), als auch Pflanzen bei denen der Anteil von Malat und Chlorid als Anion für importiertes Kalium in weiten Grenzen variabel ist und von den äußeren Bedingungen abhängt. Bei Vicia faba findet sich z.B. Chlorid nur zu 6 % des gesamten Anionengehalts der SZ beteiligt, wenn die Epidermen auf chloridfreien Medien inkubiert werden (Raschke und Schnabl, 1978), während sich eine 50 %ige Beteiligung von Chlorid bei Inkubation auf chloridhaltigen Medien findet.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß die Variabilität des Anionenverhältnisses bei Commelina communis nur relativ gering ist. Die $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen lassen erkennen, daß auf chloridfreien Medien (Kaliumsulfat) die Malatwerte der Schließzellen nur relativ wenig erhöht sind. Es scheint in diesem Falle die Ladungskompensation durch internes Malat weit weniger effektiv, als durch extern importierte Chloridionen. So verläuft denn auch bei Commelina communis die sichtbare Stomataöffnung auf Lösungen mit impermeablen Anionen (Sulfat, Iminodiacetat) weit weniger effektiv, als auf KCl-Lösungen. Auch die ABA-Wirkung läßt sich durch KCl-Lösungen kompensieren, nicht aber durch Kaliumsulfat. Das Schließen der Stomata auf Wasser läßt sich ebenfalls durch niedere KCl-Konzentrationen kompensieren, nicht aber durch Kaliumsulfatlösungen. Das zeigt, daß der gleichzeitigen Aufnahme von Chloridionen beim Öffnen eine außerordentlich wichtige Rolle zukommt.

Worin ist nun der offensichtlich wenig effektive Mechanismus der Malatkompensation zu suchen. Vielleicht bietet der Öffnungsmechanismus der Alliumstomata dafür eine Erklärung. Die Schließzellen von Alliumarten besitzen keine Schließzellenstärke. Das bedeutet, daß nur geringe interne Mengen an Malat vorhanden sind, da ja PEP nicht aus Stärke gebildet

werden kann. Damit fehlt aber auch eine ausreichende Protonenquelle. Trotzdem ist durch gleichzeitig aufgenommenes Chlorid eine normale Stomataöffnung zu erreichen.

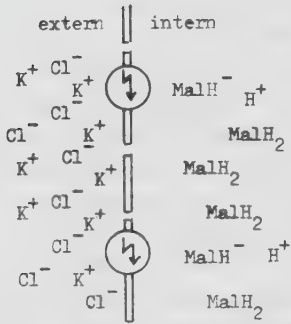
Die Untersuchungen in dieser Arbeit zeigen, daß auch bei Commelina communis die zur Verfügung stehende Malatmenge während der Lichtphase infolge der Gluconeogenese nur beschränkt ist. Nur zu Beginn steht eine ausreichende Malatmenge und somit auch Protonenquelle zur Verfügung. Bei Inkubation der Epidermen auf Kaliumlösungen mit impermeablen Anionen könnte sich die Öffnungshemmung durch eine zu geringe interne Protonenverfügbarkeit erklären, zumal für jedes importierte Kaliumion mindestens zwei Protonen exportiert werden müssen (Poole, 1978).

Doch auch der Protonenextrusion, bzw. der Ionenaufnahme, auf kaliumchloridhaltigen Medien sollten Grenzen gesetzt sein. Da bei Commelina communis die interne Kaliumkonzentration beim Öffnen der SZ von ca. 50 mM auf 500 mM steigt (Humble und Raschke, 1973) müßte die Protonenextrusion zu einer extremen Ansäuerung des externen Milieus führen. Direkte Bestimmungen der pH-Werte von Schließzellen, Nebenzellen und Epidermiszellen bei Commelina communis zeigen aber nur geringe pH-Unterschiede zwischen offenen und geschlossenen Schließzellen bzw. deren Umgebung (Δ pH 0,6) (Penny und Bowling, 1974). Dieses Phänomen und auch das normale Öffnen der Alliumstomata ließe sich durch einen elektroneutralen HCl-Cotransport erklären, denn dadurch würden intern wieder neue Protonen zur Verfügung stehen und andererseits die pH-Verschiebung von innen nach außen nur relativ gering bleiben. Als treibende Kraft für diesen Transport wären einerseits der hohe Protonendiffusionsgradient und andererseits der Chloriddiffusionsgradient anzuführen. Elektroneutrale HCl-Transportmechanismen wurden

bei Algen nachgewiesen (Spear, Barr, Barr, 1968) und ebenfalls bei Membranvesikeln von Maiskoleoptilen (Hager und Helmle, 1981). Auch die Stimulierung der Stomataöffnung durch Säuren kann teilweise auf diesen Transportmechanismus zurückgeführt werden (Dittrich, Mayer, Meusel, 1978). Letztlich werden also in den Vakuolen der Stomata Kaliummalat und Kaliumchlorid angehäuft. Die ionenaufnehmenden Mechanismen bei Commelina communis sind in Abb. 29 zusammengefaßt.

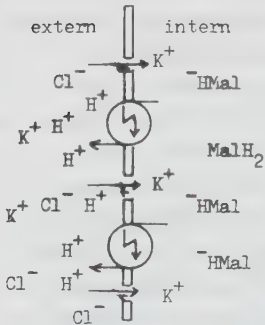
Große Bedeutung scheint den aufgenommenen Anionen auch beim Schließen zuzukommen. Da die Kaliumpermeabilität der Membran hoch ist, muß notwendigerweise die Anionenpermeabilität gering sein, da dies sonst zur unkontrollierten Diffusion der osmoaktiven Ionen führen müßte. Bereits Pallaghy (1968) konnte durch elektrophysiologische Untersuchungen an Stomata dafür Hinweise finden. Dasselbe ergibt sich auch aus den vorliegenden Versuchen mit Phloridzin und Phloretin, die beide die Kalium- und die Chloridpermeabilität der Membran beeinflussen. Beide führen bei Commelina communis sowohl zu Öffnungshemmung, als auch zu einer Schließbeschleunigung. Da die Erhöhung der Kaliumpermeabilität durch Valinomycin ohne Einfluß bleibt, ist anzunehmen, daß nur die erhöhte Chloridpermeabilität der Schließzellenmembran schließlich zum Efflux von Kalium und Chlorid führt und somit Öffnungshemmung und Schließbeschleunigung bewirkt. Der Export der osmoaktiven Ionen selbst scheint passiver Natur zu sein, wie sich aus den Temperaturabhängigkeiten des Schließens ergibt. Die Ionenströme folgen in diesem Falle den Konzentrationsgradienten durch einfache Diffusion. Die Akkumulation der Kaliumionen in Schließzellen ist daher vor allem auf die

Abb.29: Modell zur Kaliumchloridakkumulation in Schließzellen von Commelina communis beim Öffnen (④ - ATP-ase,  frei permeable Kaliumkanäle,  HCl-Kanal).

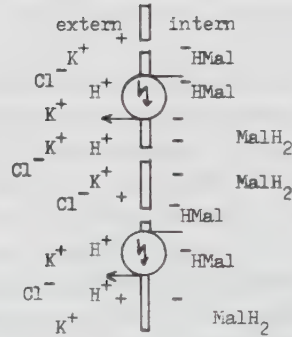


- 1) Ionische Verhältnisse an der Schließzellenmembran zu Beginn der Stomataöffnung

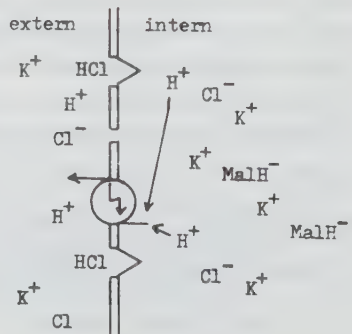
- 2) Aktiver Protonenexport durch ATP-asen: Erhöhung des negativen Membranpotentials



- 4) Das hohe externe Chlorid- und Protonendiffusionspotential treibt den elektroneutralen Transport von HCl



- 3) Passiver Transport von Kaliumionen entlang dem elektrischen Gradienten über frei permeable Kaliumkanäle



Impermeabilität der Stomataplasmamembran für Chlorid, bzw. Anionen zurückzuführen. Dadurch läßt sich auch die Kompensation des Schließens der Stomata in isolierten Epidermen auf Wasser durch niedere Konzentrationen von Kaliumchloridlösungen erklären. Der passive Efflux von Chlorid ist infolge der niedrigen Chloridpermeabilität nur gering und führt deshalb auch nur zu relativ geringem Kaliumefflux, was sich wiederum in einem langsamen Stomataschluß äußert. Dies kann durch Aufnahme von Kaliumchlorid kompensiert werden, wobei nur geringe externe Konzentrationen nötig sind. Kaliumsulfatlösungen bleiben dagegen wirkungslos, da die interne Ladungskompensation der Kaliumionen durch Malatanionen weniger effektiv ist.

Ähnlich läßt sich auch die ABA-Wirkung erklären. Die $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungen zeigen, daß die Malatpermeabilität der Schließzellenmembran, unter dem Einfluß von ABA, effektiv erhöht wird. Es kann angenommen werden, daß auch die Permeabilität für Chloridionen erhöht wird, da bei alleiniger Erhöhung der Malatpermeabilität, der Stomataschluß nur langsam erfolgen dürfte. In diesem Falle könnte ja Chlorid und damit auch Kalium nur über passive Leckströme in den Apoplasten diffundieren. Auch MacRobbie (1981) konnte einen durch ABA induzierten erhöhten Efflux von Anionen feststellen. Die Kompensierbarkeit der ABA-Wirkung durch Kaliumchlorid weist ebenfalls in diese Richtung und zeigt auch, daß die Protonenexportmechanismen durch ABA offensichtlich nicht betroffen sind. Chloridtransport und damit Kompensation der ABA-Wirkung kann nur durch funktionierende Protonenpumpen erfolgen. Die Untersuchungen von MacRobbie (1981b), Weyers und Hillmann (1980) und Gepstein et al. (1982) bestätigen dieses Bild.

Die Erhöhung der Anionenpermeabilität der Schließzellenmembran durch ABA wird wahrscheinlich durch einen protein-katalysierten Prozeß gesteuert, da eine große Temperaturabhängigkeit der ABA-Wirkung festgestellt wurde.

Die Schließreaktion der Commelinastomata auf Calciumlösungen läßt sich durch die vorliegenden Versuche ebenfalls erklären. So ist davon auszugehen, daß erhöhte externe Calciumkonzentrationen zu einem erhöhten passiven Influx führt, wobei das innen negative Membranpotential unterstützend wirkt. Der Ladungsausgleich kann dadurch erfolgen, daß Kaliumionen im Gegenzug zu den aufgenommenen Calciumionen nach außen transportiert werden, was wiederum dadurch begünstigt wird, daß gleichzeitig der interne Kaliumdiffusionsgradient abgebaut wird.

Da nun auch Schließzellen über aktive Calciumtransportmechanismen verfügen, wird aufgenommenes Calcium wieder exportiert. Dies erfolgt möglicherweise im Gegentausch für externe Protonen, so daß ein Abbau des negativen Membranpotentials stattfindet und dadurch die Kaliumaufnahme behindert wird. Bei offenen Stomata führt dann eine passive Diffusion der Chloridionen (Leckstrom) zum langsamen Schließen der Stomata (geschlossene Stomata können erst gar nicht öffnen). Die elektrophysiologischen Untersuchungen von Saftner und Raschke (1981) bestätigen dies, da sie einen calciuminduzierten Abfall bzw. Oszillationen des Membranpotentials feststellten, was offensichtlich auf Protoneninflux zurückzuführen sein dürfte.

Die vorliegenden Ergebnisse ermöglichen die Aufstellung eines differenzierten Modells zur Physiologie der Stomatabewegung (siehe Abb.3o): Die von den Mesophyllzellen angelieferten Kohlenhydrate werden während der Dunkelphase in den

Schließzellenplastiden in Stärke umgewandelt. Gleichzeitig wird das durch Carboxylierung von PEP gebildete Malat akkumuliert.

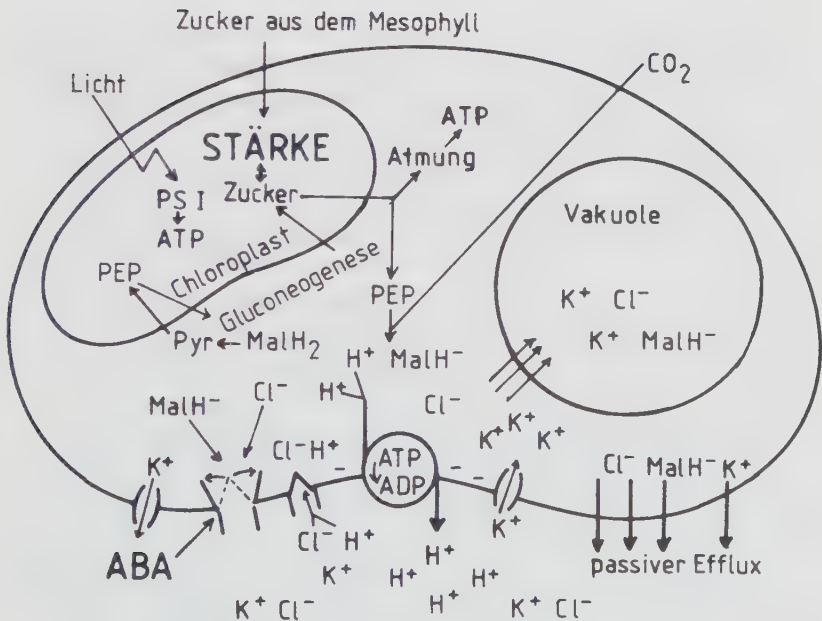


Abb.30:

Modell zur Physiologie der Stomatobewegung (Erklärung im Text) bei Commelina communis.

Zu Beginn der Lichtphase beginnt der Öffnungsprozeß, wobei Protonen über eine Protonenpumpe, z.B. eine plasmalemma-gebundene ATP-ase, nach außen transportiert werden, Protonen werden von der laufend gebildeten Äpfelsäure in mehr oder weniger ausreichender Menge angeliefert. Der Protonenexport bedingt eine Erhöhung des negativen Membranpotentials der Schließzellen, gleichzeitig wird aber auch ein pH-Gradient aufgebaut.

Die im Apoplasten reichlich vorhandenen Kaliumionen folgen dann dem elektrischen Gradienten (Membranpotential), zumal ja die Kaliumpermeabilität der Schließzellenmembran im Gegensatz zur Protonenpermeabilität groß ist. Durch den Kaliumtransport wird Ladungsausgleich erreicht, ohne daß der pH-Gradient abgebaut würde. In den Schließzellen wird jedenfalls Kaliummalat als osmoaktives Ion gespeichert.

Der durch die Kaliumaufnahme unbeeinträchtigte pH-Gradient katalysiert vermutlich nun einen elektroneutralen HCl-Symport in die Schließzellen, der vielleicht durch eine erhöhte HCl-Leitfähigkeit der Membran begünstigt wird. Die Chloridpermeabilität ist im Gegensatz dazu offensichtlich gering. Durch den HCl-Symport wird einerseits der pH-Gradient abgebaut, andererseits stehen intern wieder Protonen für die ATP-ase zur Verfügung. In den Schließzellen häuft sich KCl als weiteres osmoaktives Ion an. Als treibende Kraft sind also für den Kaliumtransport der elektrische Gradient (Membranpotential) und für den Chloridtransport der Protonengradient anzusehen.

Durch passive Leckströme entstehen auch bei offenen Stomata Verluste an osmoaktiven Ionen, die umso größer sind, je höher deren Konzentration in den Schließzellen steigt. Diese Verluste müssen zum Offenhalten der Schließzellen

dauernd ersetzt werden, deshalb erfolgt ständig ein gewisser Abbau von Stärke zu PEP und über eine Carboxylase zu Malat.

Die Protonenpumpe führt also letztlich zu einer Anhäufung von Kaliummalat und Kaliumchlorid in den Vakuolen der Schließzellen.

Das Schließen , das durch äußere Faktoren wie Dunkelheit, CO_2 -Konzentration oder Wasserversorgung eingeleitet wird, kann dadurch erfolgen, daß etwa die passiven Leckströme nicht mehr kompensiert werden, indem die Protonenpumpe gehemmt wird. Das durch ABA induzierte Schließen beruht jedoch offensichtlich auf einer proteinkatalysierten, spezifischen Erhöhung der Anionenpermeabilität. Dies bedingt einen raschen Efflux von Malat und Chlorid der von einem Efflux von Kalium gefolgt wird. Damit wird das osmotische Potential der Stomata erniedrigt und sie schließen. Die offensichtlich noch funktionierende Protonenpumpe kann unter dem Einfluß von ABA den erhöhten Efflux nicht mehr kompensieren.

Das durch Calciumionen induzierte Schließen der Stomata dagegen ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß durch den passiven Calciuminflux aktive Calciumexportprozesse induziert werden, die Protonenimport und somit auch eine Erniedrigung des negativen Membranpotentials zur Folge haben. Dadurch wird aber die Kaliumaufnahme gehemmt, so daß von einer physiologischen Revertierung des Öffnungsvorganges gesprochen werden kann.

D. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß

1. ... isolierte Epidermen von Commelina communis bei in vitro Versuchen nur kurzen Inkubationszeiten ausgesetzt sind, da ständig Ionen aus den Schließzellen in das Inkubationsmedium diffundieren.
2. ... die CO_2 -fixierende Aktivität der Epidermis auf die Schließzellen beschränkt ist, wobei als Hauptfixierungsprodukte im Licht neben Malat, Citrat und Aminosäuren auch Zucker und Stärke gebildet werden, während im Dunkeln praktisch nur organische Säuren auftreten. Letzteres deutet auf eine Lichtabhängigkeit der Gluconeogenese hin.
3. ... an Enzymen wohl MDH, malic enzyme, PEP-carboxylase und PEP-carboxykinase, nicht aber RuBP-carboxylase nachweisbar waren.
4. ... Hemmstoffe der plasmalemmagebundenen Na/K-ATP-asen das Öffnen der Stomata hemmen und die Kaliumpermeabilität der Schließzellenmembran im Gegensatz zur Chloridpermeabilität keinen Einfluß auf die Öffnungsgeschwindigkeit der Stomata ausübt.
5. ..Abscisinsäure einen erhöhten Anionenefflux aus den Schließzellen induziert, der eine deutliche Temperaturabhängigkeit aufweist, was auf einen proteinkatalysierten Mechanismus hindeutet.

6. ... die Öffnungshemmung der Schließzellen durch niedrige Ca^{++} Konzentrationen möglicherweise auf aktiven Calcium-exportmechanismen beruht, die zu einer Störung des Membranpotentials und damit zu einer Beeinträchtigung der Kaliumaufnahme führen.

Als Gesamtkonzeption kann folgender Ablauf der stomatären Öffnungsreaktion vorgeschlagen werden:

Über eine plasmalemmagebundene ATP-ase werden Protonen aktiv aus den Schließzellen transportiert. Dadurch wird das negative Ruhepotential der Schließzellen deutlich erhöht; gleichzeitig baut sich ein pH-Gradient über die Plasmalemmamembran auf. Dem elektrischen Potential folgend, können Kaliumionen wegen der guten Kaliumpermeabilität in die Schließzellen aufgenommen werden, deren Ladung teilweise durch endogen bereitgestellte Malatanionen kompensiert wird. Der restliche Ausgleich der Ladung erfolgt durch Aufnahme von Chloridionen. Ihr Transport soll in einem Protonen-Chlorid Symport erfolgen, der seine Energie aus dem Abbau des pH-(Protonen-)gradienten zieht.

Der physiologische Schließvorgang bei den Stomata beruht wahrscheinlich auf einer Hemmung der Protonenpumpe (ATP-ase).

F. LITERATURVERZEICHNIS

- Allaway, W.G.: Accumulation of malate in guard cells of Vicia faba during stomatal opening. Planta 110, 63-70 (1973).
- Allaway, W.G., Setterfield, G.: Ultrastructural observations on guard cells of Vicia faba and Allium porrum. Can. J. Bot. 50, 1405-1413 (1972).
- Arntzen, C.J., Haugh, M.F., Bobick, S.: Induction of stomatal closure by Helminthosporium maydis panthotoxin. Plant Physiol. 52, 569-574 (1973).
- Bowling, D.J.F.: Malate switchhypothesis to explain action of stomata. Nature 262, 393-394 (1976).
- Cheung, W.Y.: Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. Science 207, 19-26 (1980).
- Crompton, M., Capano, M., Carafoli, E.: The sodium induced efflux of calcium from heart mitochondria. A possible mechanism for the regulation of mitochondrial calcium. Eur. J. Biochem. 69, 453-462 (1976).
- Cummins, W.R.: The metabolism of abscisic acid in relation to its reversible action on stomata in leaves of Hordeum vulgare. Planta 114, 159-167 (1973).
- Das, V.S., Raghavendra, A.S.: Control of stomata opening by pyruvate metabolism in light. Indian J. Biol. 12, 425-428 (1974).

- Dittrich, P., Mayer, M., Meusel, M.: H^+ -stimulated opening of stomata in relation to chloride uptake by guard cells. *Planta* 144, 305-309 (1979).
- Dittrich, P., Raschke, K.: Uptake and metabolism of carbohydrates by epidermal tissue. *Planta* 134, 83-90 (1977).
- Eshel, A., Waisel, Y., Ramati, A.: The role of sodium in stomatal movements of a halophyte: a study by x-ray microanalysis. In: 7th Intl. Colloquium on Plant Analysis and Fertilizer Problems. Wehrmann, J. (ed.) Hannover: German Soc. Plant Nutrition (1974).
- Fischer, R.A.: Aspects of potassium accumulation by stomata of Vicia faba. *Aust. J. Biol. Sci.* 25, 1107-1123 (1972).
- Fujino, M.: Role of adenosinetriphosphate and adenosine-tri-phosphatase in stomatal movement. *Science Bull. Fac. Educ., Nagasaki Univ.* 18, 1-47 (1967).
- Gavalas, N.A., Manetas, Y.: Calcium inhibitor of PEP-Carboxylase: Possible physiological consequences for C4-photosynthesis. *Z. Pflanzenphysiol.* 100, 179-184 (1980).
- Gepstein, S., Jacobs, M., Taiz, L.: Inhibition of stomatal opening in Vicia faba epidermal tissue by vanadate and abscisic acid. *Plant Science Letters* 28, 63-72 (1983).
- Goller, M., Hampp, R., Ziegler, H.: Regulation of the cytosolic adenylate ratio as determined by rapid fractionation of mesophyll protoplasts of oat. *Planta* 138, 253-263 (1982).

- Hager, A., Helmle, M.: Properties of an ATP-fueled, Cl^- -dependent proton pump localized in membranes of microsomal vesicles from maize coleoptiles. Z.Naturforsch. 36c, 997-1008 (1981).
- Hager, A., Hermsdorf, P.: A $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiporter in membranes of microsomal vesicles from maize coleoptiles, a secondary energized Ca^{2+} pump. Z.Naturforsch. 36c, 1009-1012 (1981).
- Hsiao, T.C.: Stomatal ion transport. In: Ency. Plant Physiol. Part B. Lüttge, U., Pitman, M.G. (eds.) Berlin-Heidelberg-New York: Springer, 1976, Vol. III, pp 195-221.
- Humble, G.D., Raschke, K.: Stomatal opening quantitatively related to potassium transport. Evidence from electron probe microanalysis. Plant Physiol. 48, 447-453 (1971).
- Imamura, S.: Untersuchungen über den Mechanismus der Turgorschwankungen der Spaltöffnungsschließzellen. Jpn. J. Bot. 12, 251-346 (1943).
- Izawa, S.: Inhibitors of electron transport. In: Ency. Plant Physiol., Photosynthesis I. Trebst, A., Avron, M. (eds.) Berlin-Heidelberg-New York: Springer, 1977, Vol. V, pp 266-282.
- Izawa, S., Good, N.E.: Effect of parachloromercuribenzoate and mercuric ion on chloroplast photophosphorylation. In: Progress in Photosynthesis Research. Metzner, H. (ed.) Tübingen: Laupp, 1969, Vol. III, pp 1288-1298.

- Izawa, S., Winget, G.D., Good, N.E.: Phloridzin, a specific inhibitor of photophosphorylation and phosphorylation-coupled electron transport in chloroplasts. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 22, 223-226 (1966).
- Jacobs, M., Taiz, L.: Vanadat inhibition of auxin-enhanced H^+ -secretion and elongation in pea epicotyles and oat coleoptiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 7242-7246 (1980).
- Kaplan, J.H., Passow, H.: Effects of Phlorizin on net chloride movements across the valinomycin-treated erythrocyte membrane. *J. Membrane Biol.* 19, 179-194 (1974).
- Kasamo, K.: Effect of abscisic acid on the K^+ efflux and membrane potential of Nicotiana tabacum L. leaf cells. *Plant and Cell Physiol.* 22, 1257-1267 (1981).
- VanKirk, C.A., Raschke, K.: Presence of chloride reduces malate production in epidermis during stomatal opening. *Plant Physiol.* 61, 361-364 (1978a).
- VanKirk, C.A., Raschke, K.: Release of malate from epidermal strips during stomatal closure. *Plant Physiol.* 61, 474-475 (1978b).
- Lea, E.J.A., Collins, J.C.: The effect of the plant hormone abscisic acid on lipid bilayer membranes. *New Phyt.* 82, 11-18 (1979).
- Lichtner, F.T., Lucas, W.J., Spanswick, R.M.: Effect of sulfhydryl reagents on the biophysical properties on the plasmalemma of Chara corallina. *Plant Physiol.* 68, 899-904 (1981).

- Lloyd, F.E.: The physiology of stomata. Carnegie Inst. Washington, Publ. Nr. 82 (1908).
- Lucas, W.J., Alexander, J.M.: Sulfhydryl groups involvement in plasmalemma transport of HCO_3^- and OH^- in Chara carollina. Plant Physiol. 65, 274-280 (1980).
- Marré, E.: Physiologic implications of the hormonal control of ion transport in plants. In: Regulation of Cell Membrane Activities in Plants. Marré, E., Cifferi, O. (eds.). Amsterdam-Oxford-New York: North Holland Publ. Compl., 1977, pp. 185-202.
- Martonosi, A.: Calcium pumps. Fed. Proc. 39, 2401-2402 (1980).
- Meidner, H., Mansfield, T.A.: Physiology of stomata. McGraw-Hill, London, 1968.
- Miller, A.G., Spanswick, R.M.: ATP, NADH and NADPH levels in Chara and Nitella. Plant Physiol. 59, Suppl. 470, 85-89 (1977).
- Mittelheuser, C.J., van Steveninck, R.F.M.: Stomatal closure and inhibition of transpiration induced by (RS)-abscisic acid. Nature (London) 221, 281-282 (1969).
- Mohl, H. von: Welche Ursachen bewirken Erweiterung und Verengung der Spaltöffnungen? Bot. Ztg. 14, 697-704, 712-721 (1856).
- Nelson, S.D., Mayo, J.M.: The occurrence of functional non-chlorophyllous guard cells in Paphiopedilum spp. Can. J. Bot. 53, 1-7 (1975).

- Nishida, K.: Studies on stomatal movement of crassulacean plants in relation to the acid metabolism. *Physiol. Plant.* 16, 284-298 (1963).
- Outlaw, W.H., Lowry, O.H.: Organic acid and potassium accumulation in guard cells during stomatal opening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 4434-4438 (1977).
- Outlaw, W.H., Manchester, J.: Guard cell starch concentration quantitatively related to stomatal aperture. *Plant Physiol.* 64, 79-84 (1979).
- Outlaw, W.H., Manchester, J., Dicamelli, C.A.: Histochemical approach to properties of Vicia faba guard cell PEP-carboxylase. *Plant Physiol.* 64, 269-272 (1979b).
- Outlaw, W.H., Manchester, J., Dicamelli, C.A., Randall, D.D., Rapp, B., Veith, G.M.: Photosynthetic carbon reduction pathway is absent in chloroplasts of Vicia faba guard cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 6371-6375 (1979a).
- Outlaw, W.H., Mayne, C.B., Zenger, V.E., Manchester, J.: Presence of both photosystems in guard cells of Vicia faba L. *Plant Physiol.* 67, 12-16 (1981).
- Pallaghy, C.K.: Electrophysiological studies in guard cells of tobacco. *Planta* 80, 147-153 (1968).
- Pallaghy, C.K., Fischer, R.A.: Metabolic aspects of stomatal opening and ion accumulation by guard cells of Vicia faba. *Z. Pflanzenphysiol.* 71, 332-344 (1974).

- Pallas, J.E.: Guard cell starch retention and accumulation in the dark. *Botan. Gaz.* 125, 102-108 (1964).
- Pallas, J.E., Dilley, R.A.: Photophosphorylation can provide sufficient adenosine 5-triphosphate to drive K^+ movements during stomatal opening. *Plant Physiol.* 49, 649-650 (1972).
- Pemadasa, M.A., Jeyaseelan, K.: Further observations on stomatal response to sodium azide. *New Phytol.* 78, 83-89 (1977).
- Penny, M.G., Bowling, D.J.F.: A study of potassium gradients in the epidermis of intact leaves of Commelina communis in relation to stomatal opening. *Planta* 119, 17-25 (1974).
- Penny, M.G., Bowling, D.J.F.: Direct determination of pH in the stomatal complex. *Planta* 122, 209-212 (1975).
- Penny, M.G., Kelday, L.S., Bowling, D.J.F.: Active chloride transport in the leaf epidermis of Commelina communis in relation to stomatal activity. *Planta* 130, 291-294 (1976).
- Poole, R.J.: Energy coupling for membrane transport. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 29, 437-460 (1978).
- Pressmann, B.C.: In: *Inorganic Biochemistry*. G.Eichhorn (ed.) Elsevier-Amsterdam-Oxford-New York: 1973, pp 203-226.

- Racker, E.: Fluxes of Ca^{2+} and concepts. Fed. Proc. 39, 2422-2426 (1980).
- Raschke, K.: Stomatal action. Ann. Rev. Plant Physiol. 26, 309-340 (1975).
- Raschke, K.: Movement of stomata. In: Ency. Plant Physiol. Haupt, W., Feinleib, M.E. (eds.) Berlin-Heidelberg-New York: Springer, 1979, New Series Vol. VII, pp 381-441.
- Raschke, K., Dittrich, P.: (^{14}C) carbon-dioxide fixation by isolated epidermis with stomata closed or open. Planta 134, 69-75 (1977).
- Raschke, K., Humble, G.: No uptake of anions required by opening stomata of Vicia faba: Guard cells release hydrogen ions. Planta 115, 47-57 (1973).
- Raschke, K., Schnabl, H.: Availability of chloride affects the balance between potassium chloride and potassium malate in guard cells of Vicia faba. Plant Physiol. 62, 84-87 (1978).
- MacRobbie, E.A.G.: Ion fluxes in "isolated" guard cells of Commelina communis L. J. Exp. Bot. 32, 245-262 (1981a).
- MacRobbie, E.A.C.: Effects of ABA in isolated guard cells of Commelina communis L. J. Exp. Bot. 32, 563-572 (1981b).
- Saftner, R.A., Raschke, K.: Electrical potentials in stomatal complexes. Plant Physiol. 67, 1124-1132 (1981).

- Schatzmann, H.J.: Active calcium transport and Ca^{2+} -activated ATP-ase in human red cells. In: Current Topics in Membranes and Transport. Bronner, F., Kleinzeller, A. (eds.), New York: Academic Press, 1975, Vol. VI, pp 125-168.
- Schnabl, H.: The effect of Cl^- upon the sensity of starch containing and starch deficient stomata and guard cell protoplasts towards K^+ -ions, Fusicoccin and ABA. *Planta* 144, 95-100 (1978).
- Schnabl, H.: The compartmentation of carboxylating and decarboxylating enzymes in guard cell protoplasts. *Planta* 152, 307-313 (1981).
- Schnabl, H., Bornmann, Ch., Ziegler, H.: Studies on isolated starch-containing (Vicia faba) and starch-deficient (Allium cepa) guard cell protoplasts. *Planta* 143, 33-39 (1978).
- Schnabl, H., Hampp, R.: Vicia guard cell protoplasts lack photosystem II activity. *Naturwissenschaften* 67, 465-466 (1980).
- Schnabl, H., Ziegler, H.: The mechanism of stomatal movement in Allium cepa L. *Planta* 136, 37-43 (1977).
- Sebald, W., Machleidt, W., Wachter, E.: N,N'-dicyclohexyl-carbodiimide binds specifically to a single glutamyl residue of the proteolipid subunit of the mitochondrial adenosintriphosphatases from Neurospora crassa and Saccharomyces cerevisiae. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 77/2, 785-789 (1980).

- Shaw, M., MacLachlan, G.A.: The physiology of stomata I. Carbon dioxide fixation in guard cells. Can. J. Bot. 32, 784-794 (1954).
- Singh, A.P., Srivastava, L.M.: The fine structure of pea stomata. Protoplasma 76, 61-82 (1973).
- Spear, D.G., Barr, J., Barr, C.: Localization of hydrogen ion and chloride ion fluxes in Nitella. The Journal of Gen. Physiol. 54, 397-414 (1969).
- Squire, G.R., Jones, M.B.: Studies on the mechanism of action of the antitranspirant phenylmercuric acetate and its penetration into the mesophyll. J. Exp. Bot. 22, 980-991 (1971).
- Squire, G.R., Manfield, T.A.: A simple method of isolating stomata on detached epidermis by low pH treatment: observations of the importance of the subsidiary cells. New Phytol. 71, 1033-1043 (1972).
- Squire, G.R., Mansfield, T.A.: The action of Fusicoccin on stomatal guard cells and subsidiary cells. New Phytol. 73, 433-440 (1973).
- Srivastava, L.M., Singh, A.P.: Stomatal structure in corn leaves. J. Ultrastruct. Res. 39, 345-363 (1972).
- Strobant, P., Dame, J.B.: The neurospora plasma membrane Ca^{2+} -pumps. Fed. Proc. 39, 2437-2441 (1980).
- Strobant, P., Scarborough, G.A.: Active transport of calcium in Neurospora plasma membrane vesicles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3102-3106 (1979).

- Thorpe, N., Brady, C.J., Milthorpe, F.L.: Stomatal metabolism: Primary carboxylation and enzyme activities. Aust. J. Plant Physiol. 5, 485-493 (1978).
- Travis, A.J., Mansfield, T.A.: Studies of malate formation in isolated guard cells. New Phytol. 78, 541-546 (1977).
- Turner, N.C.: Action of fusicoccin on the potassium balance of guard cells of Phaseolus vulgaris. Am. J. Bot. 60, 717-725 (1973).
- Vicenci, F.F., Larsen, F.L.: The plasma membrane calcium pump: regulation by a soluble Ca^{2+} binding protein. Fed. Proc. 39, 2427-2431 (1980).
- Walker, D.A., Zelitch, I.: Some effects of metabolic inhibitors, temperature and anaerobic conditions on stomatal movement. Plant Physiol. 38, 390-396 (1963).
- Weiler, E.W., Schnabl, H., Hornberg, C.: Stress related levels of abscisic acid in guard cell protoplasts of Vicia faba L. Planta 154, 24-28 (1982).
- Weyers, J.D.B., Hillman, J.R.: Uptake and distribution of abscisic acid in Commelina leaf epidermis. Planta 144, 167-172 (1979).
- Willmer, C.M., Dittrich, P.: Carbon dioxide fixation by epidermal and mesophyll tissues of Tulipa and Commelina. Planta 117, 123-132 (1974).

- Willmer, C.M., Mansfield, T.A.: Active cation transport and stomatal opening: A possible physiological role of sodium ions. *Z. Pflanzenphysiol.* 61, 398-400 (1969).
- Willmer, C.M., Mansfield, T.A.: Effects of some metabolic inhibitors and temperature on ion-stimulated stomatal opening in detached epidermis. *New Phytol.* 69, 983-988 (1970).
- Willmer, C.M., Pallas, J.E., Black, C.C.: Carbon dioxide metabolism in leaf epidermal tissue. *Plant Physiol.* 52, 448-452 (1973).
- Willmer, C.M., Rutter, J.C.: Guard cell malic acid metabolism during stomatal movements. *Nature (London)* 269, 327-328 (1977).
- Wilson, R.H., Graesser, R.J.: Ion transport in plant mitochondria. In: *Transport in Plants, III. Intracellular Interactions and Transport Processes*. Stocking, C.R., Heber, U. (eds.). Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag, 1976, pp 377-397.
- Zeiger, E., Hepler, K.: Production of guard cell protoplasts from Onion and Tobacco. *Plant Physiol.* 58, 492-498 (1976).

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für allgemeine Botanik der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Leitung von Herrn Prof.Dr.P.Dittrich von 1978 bis 1983 angefertigt.

Herrn Prof. Dittrich möchte ich für vielfältige Ratschläge und wertvolle Diskussionen im Verlauf der Arbeit und für alle Unterstützung herzlich danken.

Mein Dank gilt auch allen kollegialen Mitarbeitern am Botanischen Institut.

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Mayer Maximilian Gebhard
Geburtsdatum	23. April 1949
Geburtsort	Immenstadt/Allgäu
Familienstand	ledig

Schulbildung

1955 - 1961	Volksschule Immenstadt
1961 - 1965	Realschule Immenstadt
1965 - 1969	Allgäu-Gymnasium Kempten

Militärdienst

1969 - 1971	Geb.Pz.Btl. 224 in Landsberg
-------------	------------------------------

Studium

1971	Beginn des Biologiestudiums an der LMU München
1978	Staatsexamen für das Höhere Lehramt in Biologie und Chemie
1978	Beginn der Dissertationsarbeit bei Prof.Dr.P.Dittrich am Botanischen Institut der Universität in München

